

**DANIELE CRISTINA VITORINO**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE  
TUBARÃO SOBRE O SISTEMA IMUNITÁRIO DE RATOS  
TREINADOS**

Dissertação de mestrado defendida como  
pré-requisito para obtenção do título de  
Mestre em Educação Física, no  
Departamento de Educação Física, Setor de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

“Este trabalho é dedicado aqueles por quem eu vivo,  
meus pais José e Neuza”.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha família que em momento algum jamais me faltou com apoio.

Ao querido prof. Luiz Claudio Fernandes por todo o incentivo, paciência, tempo e oportunidade de desenvolver este importante trabalho. Obrigada pela confiança e pelos momentos de sabedoria comigo compartilhado, que me ajudaram a crescer como pessoa e profissionalmente.

A todos os companheiros de laboratório que contribuíram para a realização deste trabalho, desde aqueles que me ajudaram com uma simples conversa a aqueles que estiveram presentes comigo nos dias de experimento. Muito obrigada a todos vocês.

Aos professores Raul Osieck e Paulo Ivo Bittencourt Junior pela gentileza e boa vontade de apreciar este trabalho.

A professora Maria Gisele, pelas inúmeras palavras de incentivo, amizade, apoio e confiança.

Ao amigo Franklin Buzzachera que sempre esteve presente nos momentos difíceis.

Aos funcionários do biotério, Claudio, aos estagiários Marcelo e Araceli, e também aqueles que sem sua participação não seria possível a realização deste, nossos queridos ratinhos.

A Universidade Federal do Paraná e a todos os funcionários pelo privilégio e oportunidade de ter feito parte desta instituição, os quais me ajudaram nessa conquista.

Ao secretario de mestrado Daniel Dias... Obrigada pela atenção e paciência.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### ABREVIATURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
1.1 Sistema Imunitário	12
1.2 Exercício Físico e o Processo Inflamatório	14
1.3 Exercício Físico e o Sistema Imunitário	17
1.4 Óleo de Fígado de Tubarão	22
1.5 Óleo de Fígado de Tubarão e o Sistema Imunitário	26
1.6 Objetivos	29
1.6.1 Objetivo Geral	29
1.6.2 Objetivos Específicos	29
<b>2 MÉTODOS</b>	30
2.1 Tipo de Estudo	30
2.2 Animais	30
2.3 Protocolo de Treinamento	31
2.4 Sobrecarga de Chumbo	31
2.5 Suplementação	32
2.6 Lactato Sérico	32
2.7 Ortotanásia dos Animais	32
2.8 Obtenções de Macrófagos e Neutrófilos	32
2.9 Soluções	33
2.10 Produção de Peróxido de Hidrogênio	34
2.11 Mensuração de Ânion Superóxido	34
2.12 Atividade Fagocítica	35
2.13 Volume Lisossomal	36
2.14 Obtenção de Linfócitos	36
2.15 Análise Estatística	37
<b>3 RESULTADOS</b>	38
3.1 Peso corporal	38
3.2 Parâmetros imunitários de macrófagos e neutrófilos	39
3.3 Proliferação de linfócitos	40
3.3.1 Proliferação de linfócitos associados ao intestino	39
3.3.2 Proliferação de linfócitos associados ao baço	42
3.3.3 Proliferação de linfócitos associados ao timo	43
<b>4 DISCUSSÃO</b>	45
<b>5 CONCLUSÃO</b>	49
<b>6.REFERÊNCIAS</b>	50

## RESUMO

Estudos prévios têm demonstrado que a suplementação crônica com óleo de fígado de tubarão (OFT) melhora a resposta imunitária de linfócitos, macrófagos e neutrófilos. De forma semelhante, o treinamento físico também tem a capacidade de estimular o sistema imunitário. Nosso principal objetivo foi investigar o efeito da suplementação crônica com OFT sobre parâmetros imunitários de ratos treinados. Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: sedentários (SED, n= 20), sedentários suplementados com OFT (SEDoft, n= 20), exercitados (EX, n= 17) e exercitados suplementados (EXoft, n= 19). Os animais nadaram por 6 semanas, 90 min por dia, 4 vezes por semana em meio líquido a temperatura de  $32 \pm 1$  °C, com uma sobrecarga correspondente a 6% do massa corporal presa ao tórax de cada rato. Os animais foram ortotansados 48 h após a última sessão de treinamento. A suplementação com OFT não alterou a fagocitose, volume lisossomal, a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio dos macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos. A proliferação de linfócitos do timo e baço foi significativamente maior nos grupos SEDoft, EX e EXoft quando comparadas à do grupo SED ( $P < 0.05$ ). A proliferação de linfócitos associados ao intestino, por outro lado, foi similar entre os quatro grupos experimentais. Nossos achados demonstram que o OFT e o EX são realmente hábeis em aumentar a proliferação linfocitária, porém sua associação não induziu a um efeito sinérgico sobre a resposta imunitária adaptativa. Em adição não encontramos qualquer efeito sobre a resposta imunitária inata.

## **ABSTRACT**

Previous studies have reported that shark liver oil (SLO) chronic supplementation improves immune response of lymphocyte, macrophage, and neutrophil. Likewise exercise training also has been shown to stimulate the immune system. We are not aware of any study about the association of exercise and SLO supplementation on immune response. Our main goal was to investigate the effect of chronic supplementation with SLO on immune innate and adaptive response of exercise-trained rats. Male Wistar rats were divided into four groups: sedentary (SED, n = 20), sedentary with SLO supplementation (SEDslo, n = 20), exercised (EX, n = 17) and exercised supplemented with SLO (EXslo, n = 19). Rats swam for 6 weeks, 90 min h/day, 4 times per week in water at  $32 \pm 1$  °C, with a load of 6.0% body weight attached to the thorax of rat. Animals were killed 48 hours after the last exercise session. SLO supplementation did not change phagocytosis, lysosomal volume, superoxide anion and hydrogen peroxide production by peritoneal macrophages and blood neutrophils. Thymus and spleen lymphocyte proliferation were significantly higher in SEDslo, EX, and EXslo groups when compared to SED group ( $P < 0.05$ ). Gut associated lymphocyte proliferation, on the other hand, was similar between the four experimental groups. Our findings show that SLO and EX indeed are able to increase lymphocyte proliferation but their association did not induce further stimulation in the adaptive immune response and also did not modify innate immunity.

## **ABREVIATURAS**

CD4- "Cluster of differentiation 4"  
CD8- "Cluster of differentiation 8"  
Con-A- Concanavalia A  
ELISA- "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
IL-1- Interleucina 1  
IL-6- Interleucina 6  
LPS- Lipopolissacarídeo  
NBT- "Nitroblue tetrazolium"  
NK- Células "Natural Killer"  
O<sup>-2</sup>- Ânion superóxido  
PBS- Solução tampão fosfato-salina  
PHA- "Phytoemaglutinina  
PK-C- Proteína quinase  
PUFA- "Polyunsaturated Fatty Acids"  
Rpm - Rotações por minuto  
Th- Célula auxiliar T helper  
TNF- Fator de Necrose Tumoral  
URTI- "Upper Respiratory Tract Infections"

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 01- Efeitos do exercício físico extenuante sobre o sistema imunitário

Tabela 02- Fagocitose, volume lisossomal e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais obtidos de ratos sedentários (SED), sedentários suplementados (SEDoft), exercitados (EX) e exercitados suplementados (EXoft).

Tabela 03- Fagocitose, volume lisossomal e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos sedentários (SED), sedentários suplementados (SEDoft), exercitados (EX) e exercitados suplementados (EXoft).



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Curva em “J” que mostra a relação entre a quantidade de exercício físico e o risco para infecções no trato respiratório superior (URTI).

Figura 02- Relação proposta de curva em “S” entre carga de treinamento e taxa de infecção.

Figura 03- Exemplos de compostos contendo glicerol.

Figura 04- Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns

Figura 05- Estrutura química do 1-*O*-(2-metóxi) hexadecilglicerol, um alquilglicerol metóxi substituído encontrado no óleo de fígado de tubarão.

Figura 06- Evolução da massa corpórea dos animais durante as 6 semanas de treinamento.

Figura 07- Proliferação em contagens por minuto (cpm) de linfócitos associados ao intestino dos quatro grupos experimentais (SED, SEDoft, EX e EXoft) .

Figura 08- Proliferação em contagens por minuto (cpm) de linfócitos do baço dos 4 grupos experimentais (SED, SEDoft, EX e EXoft) .

Figura 09- Proliferação em contagens por minuto (cpm) de linfócitos presentes no timo dos 4 grupos experimentais (SED, SEDoft, EX e EXoft) .

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMA IMUNITÁRIO

A função primária do sistema imunitário é a proteção do hospedeiro contra microorganismos patogênicos (CHAPLIN, 2006). A defesa contra os microorganismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas reações mais tardias da imunidade adquirida. A imunidade inata consiste de mecanismos existentes antes da infecção, os quais possuem rápidas respostas aos microorganismos e que reagem essencialmente do mesmo modo às infecções repetidas. Os componentes principais da imunidade inata são: (1) barreiras físicas e químicas (epitélios e substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais); (2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) e células *natural killer* (NK); (3) proteínas do sangue (incluindo os componentes do sistema complemento e outros mediadores da inflamação); e (4) citocinas, proteínas que regulam e coordenam muitas das atividades das células da imunidade inata, a qual proporciona as linhas iniciais de defesa contra os microorganismos (ABBAS *et al.*, 2003).

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra microorganismos invasores, constituindo 50-60 % de todos os leucócitos circulantes. Essas células também estão envolvidas na síntese e liberação de citocinas imunomodulatórias que influenciam a funcionalidade de linfócitos B e T, possuindo, portanto, um papel eferente, como fagocitose e degranulação, e aferente, como liberação de moléculas imunomoduladoras (PYNE, 1994).

Os macrófagos se originam de um precursor celular na medula óssea, sendo posteriormente transferidos para a circulação sanguínea como monócitos, onde ali permanecem por diversas horas até migrarem para os tecidos diferenciados em macrófagos (NATHAN, 1983). O macrófago atua como célula chave no início e operação de muitos componentes da função imunitária, uma vez que essas células fazem parte de um sistema celular altamente regulado e versátil. Como possuem atividade microbicida, os macrófagos são capazes de reconhecer e destruir invasores extracelulares ou intracelulares, sendo estes procariotos ou eucariotos (ADAMS; HAMILTON, 1984). Essas células são conhecidas também por

atuarem em uma grande variedade de funções do organismo, como o metabolismo de ferro e de lipídeos. O grande número de produtos gerados e secretados pelos macrófagos auxilia na regulação de outras células, incluindo fibroblastos e células envolvidas na formação do componente mielóide da medula óssea (COHN, 1982)

Em contraste com a imunidade inata, os mecanismos de defesa mais altamente evoluídos são estimulados pela exposição aos agentes infecciosos e aumentam em magnitude e capacidade defensiva em cada exposição sucessiva a um microorganismo em particular, sendo denominada de imunidade adquirida, pelo fato desta forma de imunidade desenvolver-se em resposta à uma infecção e adaptar-se a ela. As características que definem este tipo de imunidade incluem a grande especificidade para as distintas macromoléculas e a capacidade de memória, assim respondendo mais vigorosamente às repetidas exposições ao mesmo microorganismo. Em função de sua grande especificidade em distinguir diferentes microorganismos e macromoléculas, a imunidade adquirida também é denominada de imunidade específica, sendo os linfócitos seus componentes. Os produtos e substâncias estranhas que induzem as respostas específicas ou são alvo dessas substâncias são chamadas de antígenos (ABBAS *et al.*, 2003).

Após exposição ao antígeno ou outro agente que altere a homeostase do organismo, os linfócitos tornam-se ativados para entrar no ciclo celular e se proliferarem (BAUM; LIESEN; ENNEPER, 1994).

O sistema imunológico inato e adaptativo (ou adquirido) são freqüentemente descritos como vias separadas contrastando a resposta do hospedeiro; no entanto, essas respostas usualmente atuam juntas, com a resposta inata representando a primeira linha de defesa e a resposta adaptativa tornando-se proeminente após diversos dias quando as células antígeno-específico B e T têm se submetido a expansão clonal. Além disso, as células antígeno-específico amplificam suas respostas por recrutamento de mecanismos efetores inatos para gerar o completo controle dos microorganismos invasores. Dessa forma, embora as respostas imunológica inata e adaptativa sejam fundamentalmente distintas em seus mecanismos de ação, a sinergia entre essas é essencial para uma resposta imunológica inteiramente efetiva e intacta (CHAPLIN, 2006).

A comunicação dentro do sistema imunitário adaptativo e entre os sistemas inato e adaptativo ocorre por contato direto célula-célula e pela produção de mensageiros químicos. Estes mensageiros químicos são proteínas chamadas

citocinas que agem regulando a atividade das células que produzem citocinas e/ou de outras células. Cada citocina pode ter múltiplas atividades sobre diferentes células. As citocinas agem por se ligarem a receptores específicos na superfície celular e assim induzir mudanças no crescimento, desenvolvimento ou atividade da célula alvo. Citocinas pró-inflamatórias são predominantemente produtos do sistema imunitário. Entretanto, células endoteliais e fibroblastos também têm capacidade para produzi-las. A citocina denominada TNF (“tumor necrosis factor”) age como desencadeadora para ativar cascatas de produção de citocinas. O TNF é liberado rapidamente em resposta a agentes inflamatórios e infecciosos, e induz a produção de grande número de outras citocinas (CALDER, 2001; GRIMBLE, 1998). TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 são as citocinas mais importantes produzidas por monócitos e macrófagos. Estas citocinas estimulam neutrófilos, monócitos e macrófagos a iniciarem a destruição de células bacterianas e tumorais, estimulam a proliferação de linfócitos T e B e também estimulam a produção de outras citocinas. A produção de quantidades apropriadas de TNF, IL-1 e IL-6 são raramente benéficas em resposta à infecção, mas sua produção inapropriada pode ser perigosa e estas citocinas, principalmente o TNF, são causas de respostas patológicas que ocorrem em condições inflamatórias (CALDER, 2001). Todas as células nucleadas do organismo produzem citocinas, e similarmente expressam seus receptores em suas membranas (TANIGUCHI, 1995).

## **1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

O exercício físico provoca distúrbios em muitos componentes do sistema imunitário (ROWBOTTOM; GREEN, 2000; AKIMOTO; FURUDATE; SAITOH *et al.*, 2002; JILMA; EICHLER; STOHLAWETZ *et al.*, 1997; KELLEY, 2001), incluindo alteração no número de neutrófilos (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006), elevadas concentrações de interleucina IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (OSTROWSKI; ROHDE; ASP *et al.*, 1999; VASSILAKOPOULOS; KARATZA; KATSAOUNOU *et al.*, 2003). Essas citocinas são conhecidas por estarem também envolvidas no processo inflamatório (MEKSAWAN; VENKATRAMAN; AWAD *et al.*, 2004).

O processo inflamatório pode ser originado através de uma variedade de mecanismos fisiológicos, os quais incluem a introdução de patógenos e modificações no sistema orgânico, como estresse químico, térmico ou mecânico (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006). Na medicina do esporte, o termo inflamação é freqüentemente usado para descrever uma série de sinais e sintomas após dano tecidual muscular ou ósseo, sendo que essa denominação foi originalmente usada para descrever quatro classes de eventos que afetam a resposta do tecido ao trauma: vermelhidão, inchaço, aumento da temperatura e dor (ROCHA e SILVA, 1994). A tentativa de se reduzir ou prevenir esses sinais e sintomas da inflamação após trauma tecidual tem tornado-se um dogma, sendo que os mecanismos responsáveis pela inflamação no reparo e cicatrização de tecido ainda não estão completamente compreendidos (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006).

O processo inflamatório é definido como a proliferação de células sanguíneas brancas após dano tecidual muscular (QUINDRY; STONE; KING *et al.*, 2003). Desse modo, a resposta inflamatória origina-se logo no início do exercício físico, quando a quantidade de neutrófilos circulantes aumentam significativamente (QUINDRY; STONE; KING *et al.*, 2003; McINTYRE; REID; LISTER *et al.*, 2000). Os neutrófilos são as primeiras populações de células sanguíneas brancas a chegarem e atuar em resposta inflamatória durante o exercício físico ou dano muscular, além disso, estas células possuem mecanismos de defesa específicos e não-específicos, alguns dos quais são capazes de causar dano tecidual adicional (PEAK, 2002; CANNON; ORENCOLE; FIELDING *et al.*, 1990; ARMSTRONG, 1990).

No passado, os efeitos iniciais do dano excêntrico causado pelo exercício físico foram propostos serem resultado de um elevado número de neutrófilos circulantes, uma vez que essas células são requeridas para entrar no local de injúria e iniciar a fagocitose ou a remoção dos tecidos lesados (SMITH; McCAMMON; SMITH *et al.*, 1989). No entanto, esta resposta imediata também tem sido observada após exercício isométrico e alongamento passivo sem dano, mostrando que a presença de neutrófilos não necessariamente está relacionada à presença de lesão (SMITH; McCAMMON; SMITH *et al.*, 1989).

A neutrofilia precoce pós-exercício é provavelmente devida a uma combinação de fatores (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006). Durante o repouso, mais da metade dos neutrófilos circulantes encontram-se marginados ao

longo da parede endotelial dos vasos sanguíneos. No início do exercício, o aumento na epinefrina circulante, fluxo sanguíneo e moléculas sinalizadoras celulares removem esses neutrófilos do endotélio, permitindo a estes acesso a circulação e se redistribuírem no corpo, conforme a necessidade do organismo (QUINDRY; STONE; KING *et al.*, 2003; McINTYRE; REID; McKENZIE, 1995; PYNE, 1994). Os mecanismos pelos quais os neutrófilos se translocam até o tecido lesionado estão apenas começando a ser compreendidos, o que poderia representar uma estratégia chave de intervenção para limitar certos aspectos da inflamação (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006).

O músculo esquelético produz e libera continuamente citocinas, peptídeos e proteínas de baixo peso molecular que auxiliam a controlar e mediar interações entre as células envolvidas na resposta imunitária (BAGBY; CROUCH; SHEPHERD, 1996; DINARELLO, 1994), numa tentativa também de manter a homeostase e regular a sua função. Distúrbios simples no músculo esquelético, tais como o alongamento ativo durante a contração excêntrica, aumentam significativamente a expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (MALM; NYBERG; ENGSTROM, 2000). Essas citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de moléculas de adesão leucócito-endotelial (E-selectina) no interior do endotélio dos vasos sanguíneos adjacentes (CANNON; ST. PIERRE, 1998; WELLER; ISENMANN; VESTWEBER, 1992). A ativação do endotélio ocorre em local específico e pode resultar em liberação adicional de IL-1 $\beta$ , além de citocinas pró-inflamatórias adicionais, incluindo IL-6 e IL-8, as quais estão relacionadas à neutrofilia (KAPLANSKI; FARNARIER; KAPLANSKI *et al.*, 1994; DETMERS; LO; OLSEN-EGBERG *et al.*, 1990; LIU; SPOLARICS, 2003). Em contrapartida, foi atribuída a IL-6 também um efeito antiinflamatório quando esta é liberada durante a realização de exercício físico e posicionamentos que promovem estímulos reflexos proprioceptivos. Além disso, a IL-6 também atua aumentando a produção de IL-10 e de IL-Ra (molécula inibitória dos efeitos inflamatórios causados pelas citocinas pró inflamatórias) (WINKELMAN, 2007). Desse modo, a ativação endotelial apresenta duas finalidades principais: estimular a adesão de neutrófilos no local da lesão celular (marginação) e auxiliar a célula no recrutamento adicional de neutrófilos (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006).

### 1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E O SISTEMA IMUNITÁRIO

Os efeitos da atividade física no sistema imunitário têm sido constantemente investigados na literatura científica (EKBLOM; EKBLOM; MALM, 2006). Atualmente, há uma preocupação de que o exercício físico exaustivo poderia prejudicar o sistema imunitário, conduzindo o indivíduo a uma aumentada suscetibilidade a doenças, nas quais as infecções virais, especialmente as do trato respiratório superior (URTI, do inglês *Upper Respiratory Tract Infections*), têm sido foco. Em contrapartida, estudos têm demonstrado que o exercício de intensidade moderada reduz as taxas de infecção, especialmente entre os idosos (NIEMAN; MILLER; HENSON *et al.*, 1993); entretanto, há uma carência de estudos controlados envolvendo grandes populações (WOODS *et al.*, 2002).

Buscando explicar a possível suscetibilidade às infecções devido à prática de exercício físico exaustivo, diversos estudos têm investigado os efeitos dessa atividade sobre as células sanguíneas brancas, substâncias sinalizadoras e imunidade na mucosa (EKBLOM; EKBLOM; MALM, 2006). Evidências demonstram que modificações na mensuração do fenótipo de células sanguíneas brancas após exercício físico extenuante podem persistir após setenta e duas horas, a qual poderia ser afetada pelo modo e duração da atividade (PEAK, 2002). O evento mais proeminente e consistente durante o exercício físico é a neutrofilia e o reduzido número de células NK, poucas horas após o término da atividade (PEDERSEN; ULLUM, 1994; PEAK, 2002).

A ocorrência de decréscimo na porcentagem de linfócitos Th1 circulantes, mas não de Th2, têm sido demonstrados após o exercício físico prolongado extenuante (STEENBERG; TOFT; BRUUNGAARD *et al.*, 2001) e grandes cirurgias (BLOTTA, 1997). Além disso, alterações no balanço de linfócitos Th1/Th2 em favor da dominância do linfócito Th2 poderia prover uma explicação para a elevada suscetibilidade às infecções seguindo o exercício prolongado (STEENBERG; TOFT; BRUUNGAARD, *et al.*, 2001) e também a cirurgia (BERGUER *et al.*, 1999).

Em relação à proliferação de linfócitos, a maioria dos estudos usaram mitógenos que induzem muitos, ou todos os linfócitos de certo tipo a se

proliferarem (JANEWAY; TRAVERS, 1994). Estudos em seres humanos indicam que há declínio na resposta dos linfócitos aos mitógenos fitoemaglutinina (PHA) e concavalina-A (Con-A) durante e por até muitas horas após o exercício; isto também foi detectado consistentemente em estudos com animais, (Tabela 01) ocorrendo, pelo menos em parte, devido ao aumento das células NK na circulação (FRY *et.al.* 1992).

TABELA 01. Efeitos relatados do exercício físico extenuante sobre o sistema imunitário.

	Durante Exercício	Após Exercício
Contagem de neutrófilos	↑	↑↑
Contagem de monócitos		↑
Contagem de linfócitos	↑	↓
Contagem células T+CD4	↑	↓
Contagem células T+CD8	↑	↓
Contagem de células B +CD19	↑	↓
Contagem de células NK+CD16+56	↑	↓
Apoptose linfócitos	↑	↑
Resposta proliferativa aos mitógenos	↓	↓
Resposta dos anticorpos <i>in vitro</i>	↓	↓
IgA da saliva	↓	↓
Atividade das células NK	↑	↓
Atividade das células LAK	↑	↓
Proteína C-reativa		↑
Concentração plasmática de TNF- $\alpha$	↑	↑
Concentração plasmática de IL-1	↑	↑
Concentração plasmática de IL-6	↑↑	↑
Concentração plasmática de IL-1ra	↑↑	↑
Concentração plasmática de IL-10	↑	↑
Concentração plasmática de TNF-R	↑	↑
↑- Acréscimo; ↓- Decréscimo; ↑↑- Acréscimo acentuado; TNF- $\alpha$ -fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; TNF-R- receptor do fator de necrose tumoral; IL- interleucina; MIP- proteína inflamatória macrófago.		



Intensos períodos de treinamento físico são freqüentemente associados com imunossupressão (FITZGERALD, 1988; MACKINNON, 2000) e elevada incidência de infecções (GLEESON, 2000). Baseado nestes e em outros achados têm sido hipotetizado que poderia haver um elevado risco à infecções durante as horas subseqüentes ao exercício físico, comumente referido como “Teoria da Janela de Oportunidade” (PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 1995).

A imunodepressão é reconhecida pela diminuição das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, da atividade de neutrófilos, prejuízo da síntese de anticorpos e redução na concentração de imunoglobulinas no sangue e saliva (PEDERSEN, 2000).

Devido às numerosas sessões de treinamento exaustivo, maiores episódios de URTI são verificados em atletas de elite do que em indivíduos não atletas durante um dado período de tempo. Entretanto, apenas pequenas diferenças têm sido reportadas quando se compara com o sistema imunitário de atletas e sedentários (EKBLOM; EKBLOM; MALM, 2006). Em estudo conduzido por NIEMAN *et al* (1994), somente a atividade citotóxica das células NK foram significativamente diferentes entre maratonistas e sedentários.

Sabe-se que o exercício físico pode exercer efeitos negativos e positivos sobre a função imunitária. A relação entre exercício e suscetibilidade à infecções tem sido ilustrado no chamado modelo de curva em “J” (NIEMAN, 1994). Este modelo sugere que, enquanto a atividade física moderada poderia melhorar a função imunitária acima dos níveis observados em indivíduos sedentários, o exercício prolongado e de alta intensidade poderia prejudicar a função imunológica (GLEESON, 2007).

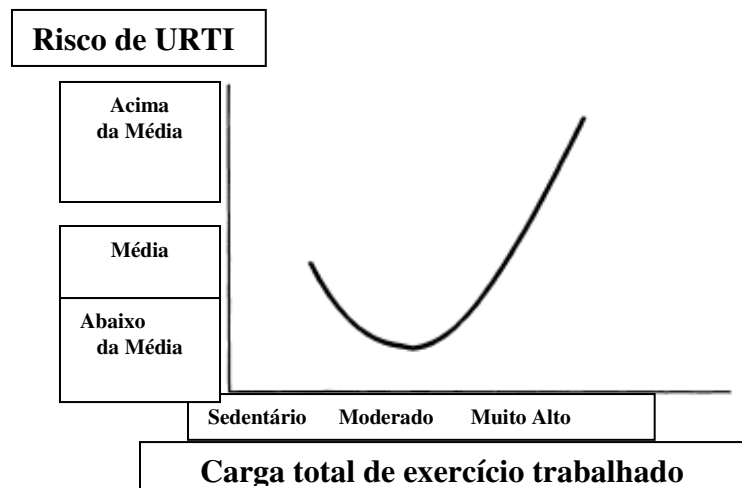


Figura 01. Curva em “J” que mostra a relação entre volume e intensidade de exercício físico e o risco para infecções no trato respiratório superior (URTI). Este modelo sugere que exercícios moderados poderiam reduzir o risco de URTI, enquanto excessivas quantidades de exercício poderiam aumentar esse risco (NIEMAN, 1994).

Em 1987 o efeito de URTI foi investigado em 2.311 maratonistas (NIEMAN *et al.*, 1990). Na semana seguinte à maratona 12,9% contraiu doenças, quando comparados à apenas 2,2% em atletas não competitivos. Corredores que treinaram >96 km/semana dobraram os casos de doenças quando comparados aos que treinaram <32 km/semana. Isto sugeriu que exercício regular e moderado diminui a suscetibilidade à infecção em indivíduos que treinaram com carga menor, mas em indivíduos que treinaram exaustivamente ou intensamente, a probabilidade de contrair infecções aumentou (CASTELL, 2002). Por exemplo, têm sido reportados que a realização de aproximadamente duas horas de exercício moderado por dia esta associado com uma redução de 29% de URTI, quando comparado ao estilo de vida sedentário (MATTHEWS, 2002). Em contraste, têm-se verificado um aumento de 100 a 500% no risco de desenvolver infecções nas semanas que precedem um evento competitivo de ultra-endurance (NIEMAN, 1990; PETERS, 1993). No entanto, o mecanismo imunológico responsável pela elevada suscetibilidade a URTI após exercício físico intenso ainda não está completamente elucidado (NIEMAN, 2000). Em estudo conduzido por Mackinnon e Hooper (1996) foi demonstrado um baixo risco para URTI em indivíduos treinados quando comparado com atletas bem treinados. Entretanto, quando se inclui atletas de elite no modelo de curva em “J”, a relação entre carga de exercício e risco de infecção é explicada através do modelo de curva em “S” (MALM, 2006).

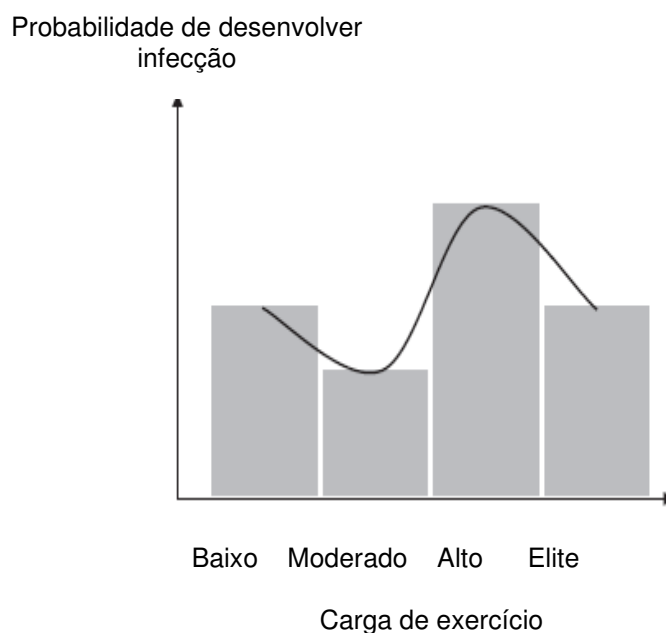


Figura 02. Relação proposta de curva em “S” entre carga de treinamento e taxa de infecção (Adaptado de Malm, 2006).

Heath *et al* (1991) verificaram que a probabilidade de desenvolver URTI foi aumentada com a média de corrida em quilômetros por ano, mas somente até 2222 km por ano. Isto representa 43 km por semana, o que equivale a uma pequena distância de corrida. Acima dos 43 km por semana, essa probabilidade permanece constante, sendo que a distância normal de corrida para atletas de elite varia de 120-200 km por semana (MALM, 2006). Nieman *et al* (1990) compararam atletas que correram uma média de 32,97 km por semana, relatando que a probabilidade para URTI foi menor para os que realizaram maior tempo de corrida. Sendo assim, baseado nos estudos publicados acima, um modelo de curva em “S” entre carga de exercício e infecção foi proposto (MALM, 2006).

As alterações no sistema imunitário induzidas pelo exercício físico podem ser influenciadas por múltiplos fatores, incluindo modo, duração e intensidade do exercício (NIEMAN, 1997), tão bem como horas e dias após a última sessão de treinamento, os quais são importantes fatores que poderiam influenciar a resposta imunitária (PEDERSEN; TOFT, 2000). Enquanto estudos anteriores têm demonstrado que a função imunitária é danificada após um tiro de exercício

moderado/intenso (PEDERSEN; TOFT, 2000; NGUYEN; TIDBALL, 2003; KWAK, 2006; SANTOS *et al.*, 2007), outros têm demonstrado que o exercício crônico moderado melhora a função imunológica (THARP; PREUSS, 1991; SUGIURA *et al.*, 2001; LEVADA-PIRES *et al.*, 2007). De fato, Sugira *et al.* (2001) verificou que a capacidade fagocítica e produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais foram significativamente aumentadas em ratos treinados quando comparados aos sedentários, após doze semanas de treinamento moderado. Similarmente, Tharp e PREUSS (1991) demonstraram que a resposta proliferativa de linfócitos do baço quando estimulados com concanavalina A (Con-A) ou lipopolissacáride (LPS) foi significativamente maior em ratos que realizaram exercício físico moderado. Juntos, esses estudos sugerem que a resposta imunitária inata e adaptativa poderiam ser modificadas pelo treinamento físico moderado.

#### **1.4 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO**

No decorrer das últimas duas décadas, o interesse pelos óleos de peixe tem aumentado consideravelmente, uma vez que estes possuem uma rica fonte de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA- *Polyunsaturated Fatty Acids*) (NAVARRO-GARCIA; PACHECO-AGUILAR; VALLEJO-CORDOVA *et al.*, 2000). Dois desses PUFAs, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA) têm tido relevante importância na prevenção ou mesmo redução de doenças cardíacas (STANSBY, 1990), inflamatórias (GURR, 1993), além da possibilidade de atuação do DHA como suplemento nutricional para o cérebro e no desenvolvimento de retinas em bebês (HOFFMAN; UAUY, 1992).

O óleo de fígado de tubarão é reconhecido como importante fonte de PUFAs (BORDIER, SELLIER, FOUCAULT *et al.*, 1996), sendo inclusive empregado como medicamento para o tratamento de debilidades em geral entre os povos esquimós, habitantes da costa oeste da Noruega e Suécia (KROTKIEWSKI, PRZYBYSZEWSKA, JANIK *et al.*, 2003). Além disso, o óleo de fígado de tubarão tem sido historicamente utilizado para diversas outras finalidades terapêuticas, tais como cicatrização de feridas, tratamento e irritações do trato respiratório e distúrbios alimentares (KROTKIEWSKI; PRZYBYSZEWSKA; JANIK *et al.*, 2003).

O conteúdo lipídico encontrado nas células de fígado de tubarão tem sido investigado e relatado na literatura desde os meados de 1950. Deste conteúdo lipídico, cerca 30% a 50% corresponde a moléculas de alquilgliceróis (BROHULT *et al.*, 1977; HALLGREN *et al.*, 1978; NAVARRO-GARCIA *et al.*, 2000)

Os alquilgliceróis têm na sua estrutura química, via uma ligação éter, um ácido graxo ligado a uma longa cadeia carbônica, saturada ou insaturada e unidas por numerosas duplas ligações, sendo que diversas destas são derivadas de éter lipídeo (HALLGREN; LARSSON, 1962).

A ligação éter é a chave para o entendimento funcional dos alquilgliceróis. A ligação C-O-C é encontrada em muitos compostos biológicos importantes, como a tiroxina da glândula tireóide por exemplo. Os éteres gliceróis são muito difundidos, sendo estes isolados de muitas formas de vida e em diferentes arranjos moleculares. A estrutura básica destes compostos consiste de uma molécula de glicerol com um ou mais grupamento hidroxila sendo substituída por uma longa cadeia de ácido graxo (PUGLIESE; JORDAN; CEDERBERG *et al.*, 1998).

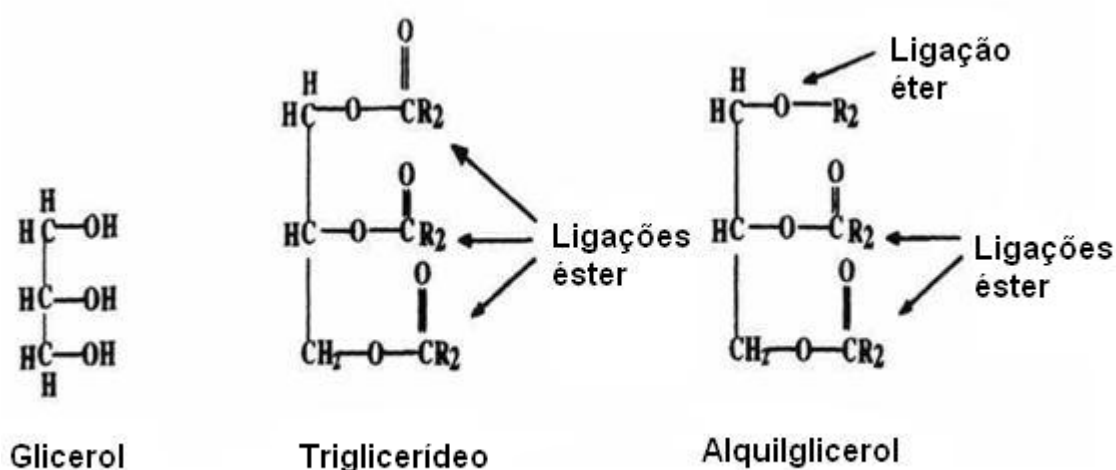


Figura 03. Exemplos de compostos contendo glicerol. Observe que a molécula de glicerol contendo três carbonos constitui a estrutura básica para as outras duas moléculas. Note também que o triglicerídeo contém somente ácido graxo ligado a éster, enquanto que o alquilglicerol contém também ácido graxo ligado a éter.

Os alquilgliceróis mais comuns são os alcoóis quimil (hexadecil), batil (octadecil) e selaquil (octadecenil) (HALLGREN; LARSSON, 1962) (figura 04). Dependendo da espécie de tubarão, o óleo extraído pode ser rico em 1-O-alquilglicerol, o qual exerce efeitos bacteriostáticos, fungistáticos, antiinflamatórios e hematopoiéticos (BORDIER; SELIER; FOUCAULT, *et al.*, 1996); ou esqualeno, composto orgânico verificado comumente na superfície da pele humana (DAVENPORT; DEPREZ, 1989).

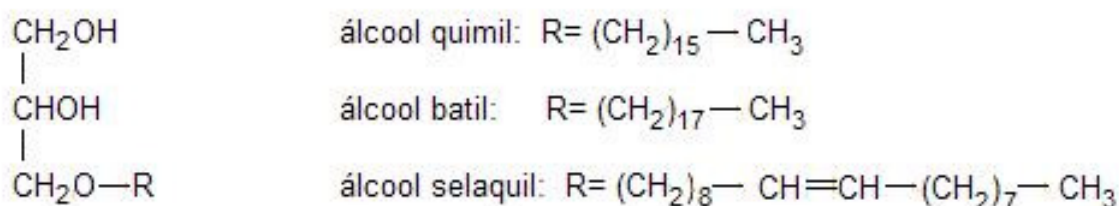


Figura 04. Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.

Uma pequena quantidade de alquilgliceróis é encontrada nas células vivas de grande parte dos tecidos animais, principalmente nos órgãos hematopoiéticos, incluindo medula óssea, baço, fígado, tecidos linfáticos e sangue (SNYDER; WOOD, 1969). Os gliceróis éter lipídicos também são encontrados no colostro humano, leite de ovelha e humano, sendo que este contém aproximadamente dez vezes mais alquilglicerol que o leite de vaca (HALLGREN; NIKLASSON; STALLBERG *et al.*, 1974).

Algumas moléculas de alquilglicerol apresentam grupamento metóxi (-OCH<sub>3</sub>) no início da sua cadeia alifática, substituindo um átomo de hidrogênio. Enquanto os alquilgliceróis em geral apresentam importante atividade biológica, os alquilgliceróis metóxi-substituídos são conhecidos por serem ainda mais potentes (CARBALLEIRA, 2002). Alguns dos mais antigos lipídeos metoxilados estudados foram os alquilgliceróis metoxilados na posição 2 da cadeia alifática, onde em óleo de fígado de tubarão eles constituíam 4% do total de éteres de glicerol (CARBALLEIRA, 2002).

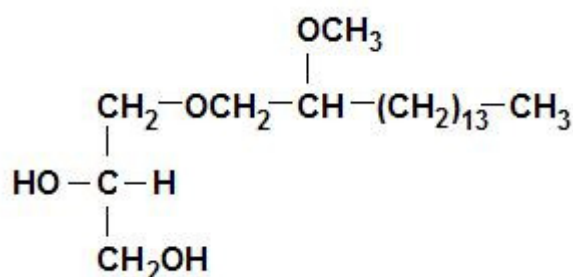


Figura 05. Estrutura química do 1-O-(2-metóxi) hexadecilglicerol, um alquilglicerol metóxi substituído encontrado no óleo de fígado de tubarão

Os benefícios da ingestão de alquilgliceróis foram verificados primeiramente em casos de leucemia infantil, em 1952, onde os pacientes ingeriam gordura não saponificável obtida da medula óssea de gado como auxiliar do tratamento contra o câncer. Antes disso, em 1930, já se administravam extratos de tecido gerador de células sangüíneas para tratar distúrbios sangüíneos como a granulocitopenia. Posteriormente foi demonstrado que a fração da medula óssea vermelha responsável por estes efeitos correspondia aos alquilgliceróis presentes no tecido (BROHULT, 1962).

Posteriormente, foram verificados diversos efeitos benéficos do uso de alquilglicerol tais como: redução dos efeitos colaterais da radioterapia (leucopenia e trombocitopenia), inibição do crescimento tumoral, além de estimular e modular a resposta imunitária (PUGLIESE *et al.*, 1998).

Muitos lipídeos sintéticos contendo alquilglicerol também possuem atividade farmacológica de grande interesse médico, como atividade antagonista do fator de ativação plaquetário e atividade neoplásica. O alquilglicerol não substituído por si só já possui várias atividades biológicas; o 1-O-dodecilglicerol estimula a produção de anticorpos em ratos (NGWENYA *et al.*, 1991) e ativa macrófagos (YAMAMOTO *et al.*, 1988), além também desta forma de alquilglicerol estimular a diferenciação de neurônios (VED *et al.*, 1991) e atividade antitumoral (ANDO *et al.*, 1972).

Em mamíferos, os alquilgliceróis vindos da dieta são absorvidos sem a quebra de sua ligação éter e são usados como precursores de fosfolipídeos de membrana em diferentes tecidos. Blank *et al* (1991) e Reichwald & Mangold (1977) relataram que os alquilgliceróis da dieta são incorporados preferencialmente nos

fosfolipídeos fosfatidiletanolamina (1-*O*-alquil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina) e fosfatidilcolina (1-*O*-alquil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), onde após serem incorporados na membrana, estes lipídeos tornam-se disponíveis às células para serem usados como precursores de outras moléculas e assim exercerem seus efeitos biológicos. Os alquilacilgliceróis gerados a partir da hidrólise de fosfatidilcolina ativam a proteína quinase C (PK-C) (ROBINSON *et al.*, 1991). No entanto, o 1-*O*-alquil-2-acil-*n*-glicerol, um glicerolipídeo encontrado na medula óssea, é considerado ser um antagonista da PK-C (FORD *et al.*, 1989).

Após a ingestão oral, a absorção dos éteres lipídeos ocorre no intestino. Cerca de 95 por cento de álcool quimil radiomarcado administrado foi absorvido no intestino, enquanto que o restante (5%) foi excretado nas fezes (BERGSTROM; BLOMSTRAND, 1956).

Os alquilgliceróis podem se incorporar na membrana de vários tipos celulares, além de plaquetas. Estudos realizados com plaquetas de coelho e alquilgliceróis *in vitro* mostraram que estas moléculas inibiram parcialmente a liberação de PAF (fator ativador de plaquetas) e a estimulação das plaquetas. A ativação de plaquetas participa de mecanismos envolvidos em várias doenças, e podem exercer importante papel no crescimento metastático de células cancerosas (PEDRONO *et al.*, 2004). Além disso, foi verificado que o tratamento de 1-*O*-alquilglicerol *in vitro* aumentou a motilidade de espermatozóides e fertilidade, sugerindo que este efeito está relacionado ao metabolismo do PAF e função do espermatozóide de suínos selvagens (CHEMINADE *et al.*, 2002).

## **1.5 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E O SISTEMA IMUNITÁRIO**

As funções do sistema imunitário podem ser influenciadas também pelo estado nutricional. Como componentes cruciais nas dietas, os lipídeos são substâncias que exercem profundo efeito na modulação do sistema imunitário. Este argumento tem sido demonstrado em numerosos estudos, incluindo um epidemiológico realizado em 1980, que revelou a baixa incidência de doenças auto-imunes em esquimós cuja alimentação era rica em óleo de peixe. Os lipídeos agem como importantes moduladores da resposta inflamatória, o que não é



surpreendente, uma vez que um grande número de compostos modulatórios são derivados da hidrólise de fosfolípídeos de membrana, pela ação de fosfolipases (fosfolipase A<sub>2</sub>, gerando prostaglandinas e leucotrienos; fosfolipase C, que gera diacilglicerol; fosfolipase D, que gera ácido fosfatídico) e esfingomielinases que geram ceramida (GRIMBLE, 1998; PABLO *et al.*, 2000).

Os alquilgliceróis possuem muitas propriedades biológicas que os diferem significativamente de outros éteres análogos. Dentre estas propriedades destacam-se sua ação antibiótica contra diversas bactérias, fungos e parasitas (HALLGREN, 1983; CROFT, NEAL; PENDERGAST *et al.*, 1987), imunoestimulação (BOERYD; NILSSON; LINDHOLM, *et al.*, 1978; BROHULT; BROHULT; BROHULT *et al.*, 1972) e seus efeitos anti-tumorais (HERMMANN; NEUMMAN, 1986; UNGER; EIBL; KIM *et al.*, 1987; BROHULT; BROHULT; BROHULT *et al.*, 1986), sendo que as duas últimas são características de compostos metil/metóxi-substituídos (PAMBLAND; SAMUELSSON; BROHULT *et al.*, 1990).

Em estudo realizado por Pambland *et al.* (1990) foi verificado também que vários tipos de alquilgliceróis poderiam estimular a resposta funcional de neutrófilos em humanos, devido à ativação do metabolismo oxidativo, aumento da concentração de cálcio intracelular, ou ambos. Ainda, diferentes tipos de alquilgliceróis têm demonstrado estimular plaquetas em diferentes vias (HANAHAHAN; MUNDER; SATUOCHI *et al.*, 1981; HADVÁRY; BAUMGARTNER, 1983). Contudo, apesar das inúmeras funções biológicas terem sido constantemente confirmadas por diversos estudos, os mecanismos moleculares precisos de ação dos alquilgliceróis ainda não estão completamente elucidados (LE BLANC; SAMULSSON; BROHULT *et al.*, 1995).

Na Europa, os alquilgliceróis têm sido usados desde 1934, utilizando-se extratos de medula óssea de gado a fim de se tratar granulocitopenia (MARBERG; WILES, 1938). Posteriormente, esses investigadores demonstraram que a fração não saponificável da medula óssea foi responsável pelo aumento no número de leucócitos.

A ativação da resposta imunitária por alquilgliceróis foi também verificada por Homma e Yamamoto (1990), os quais realizaram estudos *in vivo* administrando pequenas doses de alquilgliceróis em ratos, e também estudos *in vitro* com células peritoneais de ratos, incubadas com alquilgliceróis. Nestes estudos, foi observado que o breve tratamento com alquilgliceróis produziu significativa elevação

da atividade fagocítica de macrófagos, e que esta atividade macrofágica estimulada era dependente da participação de células peritoneais não aderentes, ou seja, de linfócitos. Esta observação sugere a ocorrência de rápida comunicação de linfócitos para macrófagos durante o período de tratamento das células com alquilgliceróis, gerando como resultado uma aumentada atividade fagocitária. Ngwenya e Foster (1991) observaram resultados similares em estudos *in vitro* com células peritoneais de camundongos deficientes em linfócitos T (BALB/c-*nu/nu*) e de camundongos normais. Os resultados demonstraram a necessidade de linfócitos T para a ativação de macrófagos mediada por alquilgliceróis, e também a estimulação da produção de anticorpos induzida por estes compostos.

## **1.6 OBJETIVOS**

### **1.6.1 OBJETIVO GERAL**

Devido à influência do óleo de fígado de tubarão e do exercício físico moderado sobre o sistema imunitário, este estudo objetiva investigar os efeitos da suplementação com óleo de fígado de tubarão associada ao exercício físico moderado sobre a resposta imunitária de ratos treinados.

### **1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Mensurar parâmetro sangüíneo indicador de exercício de intensidade moderada, no caso a concentração sérica de lactato.

Medir a taxa de proliferação de linfócitos obtidos do baço, timo e linfonodos mesentérico através da incorporação de timidina radiomarcada em DNA.

Verificar a capacidade de adesão, atividade fagocítica, volume lisossomal, ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio em neutrófilos e macrófagos.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 TIPO DE ESTUDO**

No presente estudo foi adotado delineamento de pesquisa experimental verdadeiro com grupos randomizados, divididos de acordo com o tipo de suplementação e realização de treinamento físico em: (a) sedentário (controle); (b) sedentário e suplementado com óleo de fígado de tubarão; (c) treinado e não suplementado; (d) treinado e suplementado com óleo de fígado de tubarão. Esse delineamento de pesquisa proporciona o controle de diversas fontes de ameaça à validade do estudo (THOMAS; NELSON; SILVERMAN, 2005).

### **2.2 ANIMAIS**

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Para a realização deste trabalho foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, com idade de 60 dias e massa corporal aproximado de 200 / 250g. Os animais foram divididos em 4 grupos com 20 indivíduos:

A – Sedentários (SED);

B – Sedentários suplementados com óleo de fígado de tubarão (SEDoft);

C – Exercitados (EX);

D – Exercitados e suplementados com óleo de fígado de tubarão (EXoft);

## **2.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO**

Após um período de adaptação ao meio líquido (30 minutos de natação por dia, durante dois dias, sem uso de sobrecarga), os animais foram submetidos a um programa de treinamento físico. Este consistiu de sessões de 1 hora e 30 minutos de natação, quatro vezes por semana (Seg., Ter., Qui. e Sex.), divididos em 3 séries de 30 minutos com intervalo de 5 minutos entre cada série, com sobrecarga de 6,0 % do massa corporal (máximo peso considerado como carga aeróbia, equivalente a 70 % de VO<sub>2</sub> máx.) (GOBATTO *et al.*, 2001; ROMBALDI, 1996). Após 3 semanas de treinamento, a sobrecarga foi aumentada para 6,5 % do peso corpóreo do animal. O período total de treinamento, necessário para produzir as adaptações requeridas foi de 6 semanas (GOBATTO *et al.*, 2001). Para a realização do treinamento, foi utilizado também um sistema de natação composto por 10 tubos de PVC, com 250 mm de diâmetro e 60 cm de altura, interligados através de uma central de bombeamento e aquecimento de água, comportando um animal por tubo. A temperatura da água foi mantida em 30°C - 32°C, termicamente neutra para a temperatura corpórea do rato (GOBATTO *et al.*, 2001). Todos os animais receberam água e ração à vontade e foram submetidos a ciclo invertido claro/escuro (22:00/10:00hs) e mantidos em ambiente com temperatura controlada (23°C ± 2°C).

## **2.4 SOBRECARGAS DE CHUMBO**

Todos os ratos foram pesados 3 vezes por semana, sempre no mesmo horário, em balança marca Marte modelo Urano. Bolinhas de chumbo foram utilizadas como sobrecarga, ajustadas semanalmente de acordo com a variação da massa corporal dos animais. A sobrecarga com chumbo foi armazenada em coletes e presos ao dorso do animal. As sobrecargas utilizadas foram de 6 % até a 3ª semana, passando a 6,5 % da massa corpórea do animal até a 6ª e última semana de treinamento (GOBATTO *et al.*, 2001).

## **2.5 SUPLEMENTAÇÃO**

A suplementação com óleo de fígado de tubarão foi feita na dose de 1 g/kg do peso corpóreo do animal, utilizando-se pipeta de volume ajustável, durante as 6 semanas de treinamento, 6 vezes por semana (Seg., Ter., Quart., Quint., Sext., Sáb.), sempre na parte da manhã.

## **2.6 LACTATO SÉRICO**

O lactato sérico dos animais foi mensurado uma vez por semana (sexta-feira) utilizando-se lactímetro (Accutrend lactate), imediatamente após o término do treinamento. Para tanto, foi coletado uma gota de sangue (10 a 15 µL) da extremidade da cauda dos ratos.

## **2.7 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS**

Os ratos foram ortotanasados utilizando-se uma guilhotina, dois dias após o último dia de treinamento. Foram retiradas amostras de sangue, baço, timo e linfonodos mesentérico de cada animal.

## **2.8 OBTENÇÕES DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS**

Após a ortotanásia, a pele da região abdominal foi removida e 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4) foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Após breve massagem na região, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido

contendo as células foi aspirado com o auxílio de pipeta esterilizada de plástico, tipo Pasteur. Em seguida, estas células foram centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1200 rpm, 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em três mL de PBS, para posterior análise de parâmetros imunitários.

Os neutrófilos foram isolados conforme método proposto por Bøyum (1976). O sangue dos animais foi coletado em tubos tipo falcon contendo anticoagulante (EDTA) e mantido sob refrigeração. Posteriormente, o sangue foi centrifugado no próprio tubo a 1200 rpm a 4 °C por min. O plasma foi separado e o restante do sangue, transferido para tubo tipo falcon de 50 ml, acrescentando-se o mesmo volume em PBS. Em tubos contendo 3 ml de Ficoll-Paque PLUS foi acrescentado 8 ml do sangue diluído em PBS. Os tubos foram centrifugados a 1400 rpm a 18 °C durante 40 min. A camada superior transparente composta por células mononucleares e plaquetas foi desprezada.

A camada inferior constituída por hemácias e células polimorfonucleares foi transferida para outro tubo. Submeteu-se a amostra, duas vezes, a lise hipotônica por incubação com solução hemolítica (Tris base (tris [hidroximetil] aminometano) 17,0 mM; NH<sub>4</sub>CL 18,7 mM) em banho-maria a 37 °C por 15 min. A solução foi centrifugada a 1200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células, ressuspensas em PBS e contadas em câmara de Neubauer (CURI *et al.*, 1998).

## **2.9 SOLUÇÕES**

Os reagentes utilizados na preparação das soluções foram obtidos da Reagen (Quimibrás Indústria Química Ltda, RJ). Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador utilizado foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consiste de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro (Sigma) foi preparada pela

dissolução de 20 mg de corante em 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e a solução para uso de rotina foi preparada pela diluição de 20 µL da solução estoque em 5 mL de PBS. A solução de vermelho fenol (Sigma) para os ensaios de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consiste de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/mL peroxidase “horseradish” (Sigma) em PBS pH 7,4 a 340 mOsm, onde foi previamente adicionado 0,05% de zimosan (2,3 x 10<sup>8</sup> partículas/mL - Sigma), para os ensaios de fagocitose, obtendo-se uma solução diluindo-se 40 mg de zimosan em 6 mL de PBS e adicionou-se 600 µL de vermelho neutro.

## **2.10 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por Pick & Mizel (1981), modificado. Através da oxidação de vermelho fenol é possível detectar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alíquotas de 100 µl de solução de macrófagos e 10 µl de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 mM) foram colocadas em placas de ELISA. Após 1 hora de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os pocinhos receberam 100 µl da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zimosan. Em seguida os macrófagos e neutrófilos foram incubados por mais 30 minutos e após o término deste tempo a leitura foi feita no comprimento de onda de 620 nm em espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os resultados foram determinados a partir de uma curva padrão e expressos em absorbância/10<sup>6</sup> células.



## 2.11 MENSURAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO

A geração de ânion superóxido foi determinada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT – Sigma), composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Os macrófagos (450 µl) foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT e 30 µl de PMA (80 mM) em PBS a 37 °C. Esta reação será interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada rapidamente (30 segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento foi solubilizado em 0,9 mL de ácido acético a 50% e sonicado (1 pulso de 30”). Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec – 2000). Os dados serão expressos em absorbância/10<sup>6</sup> células.

## 2.12 ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Foi utilizado o método descrito por Pipe *et al.* (1995). Foram depositados 100 µL da solução de macrófagos e neutrófilos obtidos como descrito acima, em placa do tipo ELISA e adicionado 10 µL de zimosan (2,3 x 10<sup>8</sup> partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubado por 30 minutos. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador para interromper o processo de fagocitose e 30 minutos depois, a placa foi lavada com PBS e em seguida, centrifugada, por 5 minutos a 1.500 rpm, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. O vermelho neutro no interior dos fagócitos foi solubilizado utilizando-se 100 µL de solução de extração. Após 30 minutos, foi feita a leitura das placas, a 550 nm utilizando espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos em absorbância/10<sup>6</sup> células.

## 2.13 VOLUME LISOSSOMAL

Para esta análise, foi utilizado o método descrito por Pipe *et al.* (1995), onde em placa do tipo ELISA foi depositado 100 µL da solução de macrófagos e neutrófilos adicionado 20 µL de vermelho neutro a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os pocinhos lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Foram adicionados 100 µl de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente no lisossomo, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Finalmente, após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos em absorbância/10<sup>6</sup> células.

## 2.14 OBTENÇÕES DE LINFÓCITOS E PROLIFERAÇÃO LINFOCITARIA

Os órgãos linfóides baço, timo e linfonodos mesentéricos foram mantidos em PBS com antibióticos (penicilina 10.000 e estreptomicina 10mg/L) (PBS+AB), e macerados com auxílio de embolo de seringa e peneira de malha fina, em placa de petri. O conteúdo macerado foi filtrado em papel filtro Whatman e centrifugado (1.200 rpm ou 400 G, 4 graus °C) por duas vezes durante 10 minutos. Uma alíquota de células foi diluída 1:100 em salina e 100 µl desta foi misturado ao mesmo volume de azul de tripan para contagem da viabilidade celular em câmara de Neubauer.

Os linfócitos foram cultivados em placas de 96 escavações, 180 µl de solução de células contendo 2×10<sup>5</sup> células/ escavação, a 37 °C em atmosfera de 95% ar/ 0,5% CO<sub>2</sub> por 48 h, estimuladas ou não com 20 µl/ escavação do mitógeno concanavalina A (Con-A-5 µg/mL) ou LPS. Vinte microlitros/escavação de solução contendo (2-14 C)-timidina em meio de cultura (50mCi/mmol) foram adicionados por um período adicional de 18h, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Após este período as células foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (*Skatron Combi Multiple Cell Harvester*, UK) em papéis de filtro específicos para coleta (COX Scientific- England). Os discos de papel contendo a radioatividade incorporada no DNA foram levados para contagem em cintilador Beckman LS 6500.

## **2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância de duas vias, tendo como fatores, o exercício e dieta, seguido de pós-teste de Bonferroni, com nível de significância para  $p < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 PESO CORPORAL**

Não houve diferença na massa inicial entre os quatro grupos (Figura 06). No entanto, após seis semanas de treinamento, o peso corporal foi significativamente menor nos ratos que se exercitaram ( $334,9 \pm 8,2$  e  $353,6 \pm 8,2$  para os grupos EX e EXoft, respectivamente) quando comparado aos grupos sedentários ( $379,7 \pm 12,8$  e  $383 \pm 6,3$  gramas para os grupos SED e SEDoft, respectivamente) ( $p < 0.05$ ).

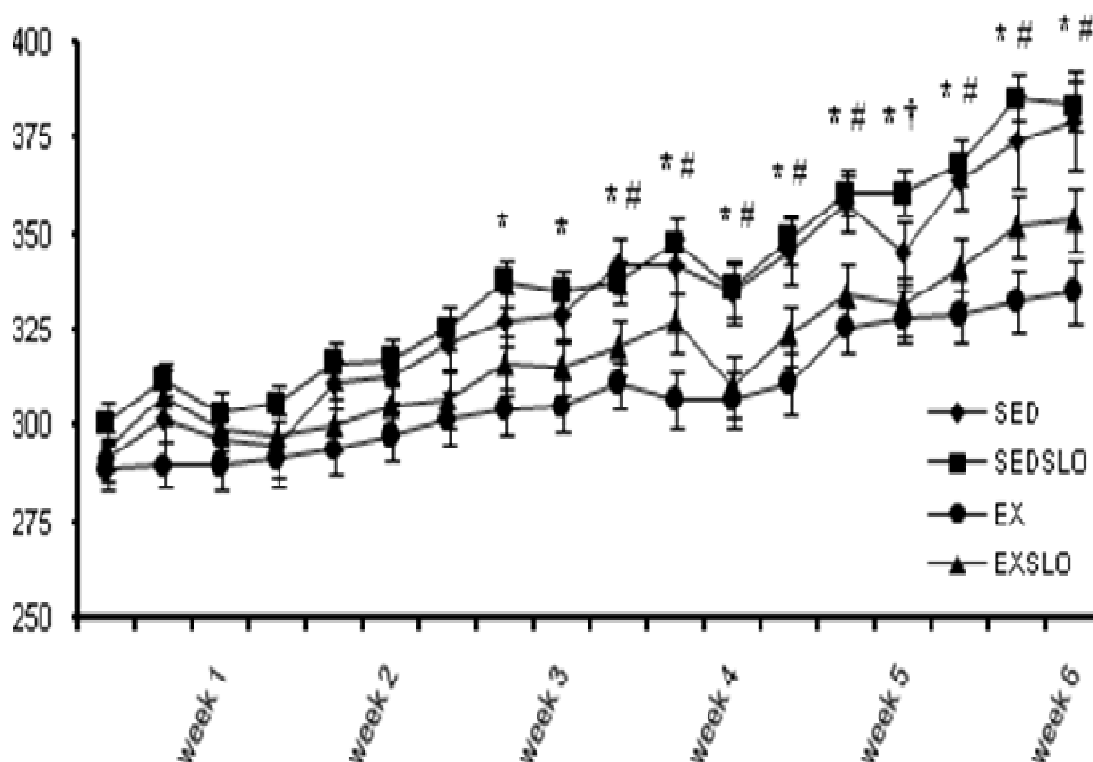


Figura 06. Evolução da massa corpórea dos animais durante as 6 semanas de treinamento. A partir da semana 3 os animais sedentários (SED e SEDslo) tiveram maior ganho de peso que ambos os exercitados ( $p < 0,05$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 20, 20, 17 e 19 animais dos grupos SED, SEDslo, EX e EXslo respectivamente.

†  $P < 0,05$ , SED versus EX; \*  $P < 0,05$ , SEDslo versus EX; #  $P < 0,05$ , SEDslo versus EXslo.

### 3.2 PARÂMETROS IMUNITÁRIOS DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS

Não houve diferença significativa ( $P < 0.05$ ) entre os 4 grupos na fagocitose, volume lisossomal e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais (Tabela 02) e neutrófilos sanguíneos (Tabela 03).

Tabela 02. Fagocitose, volume lisossomal e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais obtidos de ratos sedentários (SED), sedentários suplementados (SEDoft), exercitados (EX) e exercitados suplementados (EXoft).

Grupos	Fagocitose (absorbancia/ 10 <sup>5</sup> células)	Volume lisossomal (absorbancia/ 10 <sup>5</sup> células)	Anion superóxido (absorbancia / 10 <sup>5</sup> células)	Peróxido de hidrogênio (absorbancia / 10 <sup>5</sup> células)
SED	0.521 ± 0.060	0.151 ± 0.012	0.411 ± 0.038	0.235 ± 0.023
SEDoft	0.455 ± 0.039	0.149 ± 0.010	0.327 ± 0.029	0.210 ± 0.024
EX	0.468 ± 0.047	0.173 ± 0.016	0.357 ± 0.035	0.237 ± 0.024
EXoft	0.446 ± 0.046	0.163 ± 0.017	0.331 ± 0.029	0.190 ± 0.024

Tabela 03. Fagocitose, volume lisossomal e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos sedentários (SED), sedentários suplementados (SEDoft), exercitados (EX) e exercitados suplementados (EXoft).

Grupos	Fagocitose (absorbancia/ 10 <sup>5</sup> células)	Volume lisossomal (absorbancia/ 10 <sup>5</sup> células)	Anion superóxido (absorbancia / 10 <sup>5</sup> células)	Peróxido de hidrogênio (absorbancia / 10 <sup>5</sup> células)
SED	0.413 ± 0.113	0.151 ± 0.008	0.318 ± 0.056	0.197 ± 0.038
SEDoft	0.434 ± 0.088	0.187 ± 0.011	0.261 ± 0.039	0.169 ± 0.033
EX	0.457 ± 0.085	0.214 ± 0.017	0.314 ± 0.041	0.160 ± 0.030
EXoft	0.520 ± 0.088	0.301 ± 0.039	0.267 ± 0.038	0.180 ± 0.030

### 3.3 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

#### 3.3.1 Proliferação de linfócitos associados ao intestino

A resposta proliferativa de linfócitos associados ao intestino na ausência e presença de mitógenos (Con-A ou LPS) esta apresentada na Figura 7. Na ausência de estímulo, linfócitos obtidos de ratos sedentários suplementados com OFT (SEDoft) apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da proliferação basal quando comparada à dos sedentários (SED). O exercício físico (EX e EXoft) também causou aumento na proliferação basal de linfócitos ( $P < 0,05$ ) quando

comparada à dos sedentários (SED). No entanto, a associação entre exercício físico e suplementação com OFT (EXoft) não exerceu efeito aditivo sobre a proliferação basal de linfócitos quando comparada à de ambos fatores isoladamente ( $P > 0.05$  vs. SEDoft e EX). Na presença de Con-A, mitógeno para linfócito T, a proliferação de linfócitos associados ao intestino aumentou significativamente em 3,6, 2,1, 2,1 e 2,3 vezes nos grupos SED, SEDoft, EX e EXoft, respectivamente, quando comparada à ausência de estímulo ( $P < 0.05$ ). Sob estimulação com LPS, mitógeno para linfócito B, a resposta proliferativa de linfócitos associados ao intestino foi similar à condição basal em todos os grupos, exceto no grupo SED, onde houve um aumento de 2,5 vezes ( $P < 0.05$ )

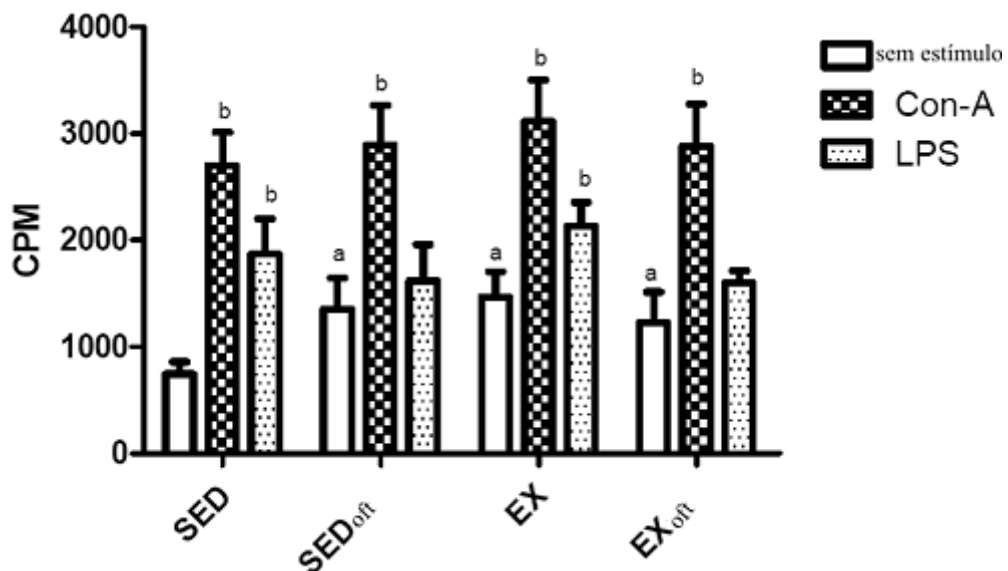


FIGURA 07. Proliferação linfocitária, em contagens por minuto (cpm) de linfócitos associados ao intestino dos 4 grupos experimentais (SED, SEDoft, EX e EXoft). ( $P < 0.05$ ), após 48 h de incubação na presença de Con-A ou LPS. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 20, 20, 17 e 19 animais dos grupos SED, SEDslo, EX e EXslo respectivamente.

a- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo SED sem estímulo.

b- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao meio do seu grupo.

### 3.3.2 Proliferação de linfócitos do baço

A resposta proliferativa de linfócitos do baço na ausência e presença de mitógenos (Con-A ou LPS) está apresentada na Figura 08. Na ausência de estímulo, linfócitos obtidos dos grupos SEDoft, EX e EXoft apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da proliferação de linfócitos quando comparada à do SED, mas não houve diferença estatística entre eles ( $P > 0,05$ ). A estimulação com Con-A aumentou a proliferação de linfócitos do baço em 2,6, 3,1, 2,1 e 2,4 vezes nos grupos SED, SEDoft, EX e EXoft respectivamente, quando comparada à proliferação basal ( $P < 0,05$  vs. sem estímulo). Os linfócitos estimulados com Con-A do grupo sedentário suplementados com óleo de fígado de tubarão (SEDoft) tiveram a maior proliferação quando comparada à dos outros grupos ( $P < 0,05$ ). Na presença de LPS, a proliferação de linfócitos B do baço aumentou em 2,5, 2,5 e 3,2 vezes nos grupos SEDoft, EX e EXoft respectivamente, ( $P < 0,05$  vs. sem estímulo), mas não houve mudança no grupo SED ( $P > 0,05$  vs. sem estímulo). Todos os grupos estimulados com LPS apresentaram uma maior proliferação linfocitária quando comparada à do grupo SED ( $P < 0,05$ ).



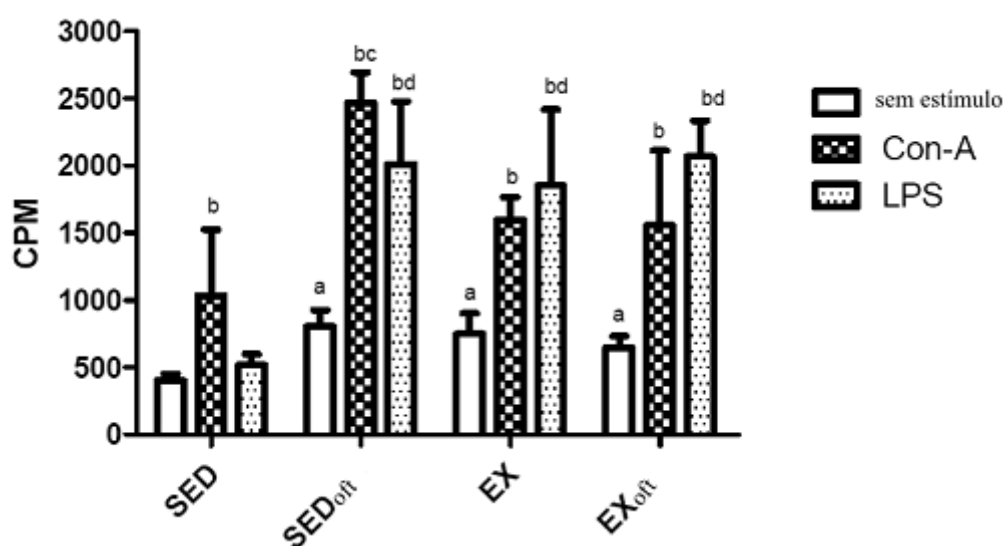


Figura 08. Proliferação em contagens por minuto (cpm) de linfócitos do baço dos 4 grupos experimentais (SED, SEDoft, EX e EXoft) ( $P < 0.05$ ) após 48 h de incubação na presença de Con-A ou LPS. Os dados representam a média  $\pm$  EPM 20, 20, 17 e 19 animais dos grupos SED, SEDslo, EX e EXslo respectivamente.

a- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo SED sem estímulo.

b- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado a proliferação basal em seu grupo sem estímulo. Basal versus Con-A.

c- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado aos grupos SED, EX e EXoft.

d- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado a proliferação basal em seu grupo. Basal versus LPS.

### 3.3.3 Proliferação de linfócitos do timo

A resposta proliferativa de linfócitos do timo na ausência e presença de mitógenos (Con-A ou LPS) está apresentada na Figura 09. Na ausência de estímulo, a proliferação linfocitária do timo foi maior ( $P < 0,05$ ) somente no grupo sedentário suplementado com OFT (SEDoft) quando comparada à do sedentário. A presença de Con-A provocou aumento de 3 vezes no grupo SED, 2,5 vezes no grupo SEDoft, 3 vezes no grupo EX e 2,6 vezes no grupo EXoft ( $P < 0,05$  vs. sem estímulo). Sob estimulação com LPS, os linfócitos dos grupos SED, SEDoft, EX e

EXoft, aumentaram a resposta proliferativa em 1,8, 3,1, 3,3 e 3,2 vezes respectivamente, quando comparada com a resposta de proliferação basal ( $P < 0,05$  vs. sem estímulo). A proliferação de linfócitos do timo na presença de LPS foi menor no grupo sedentário quando comparada á dos outros grupos ( $P < 0,05$ ).

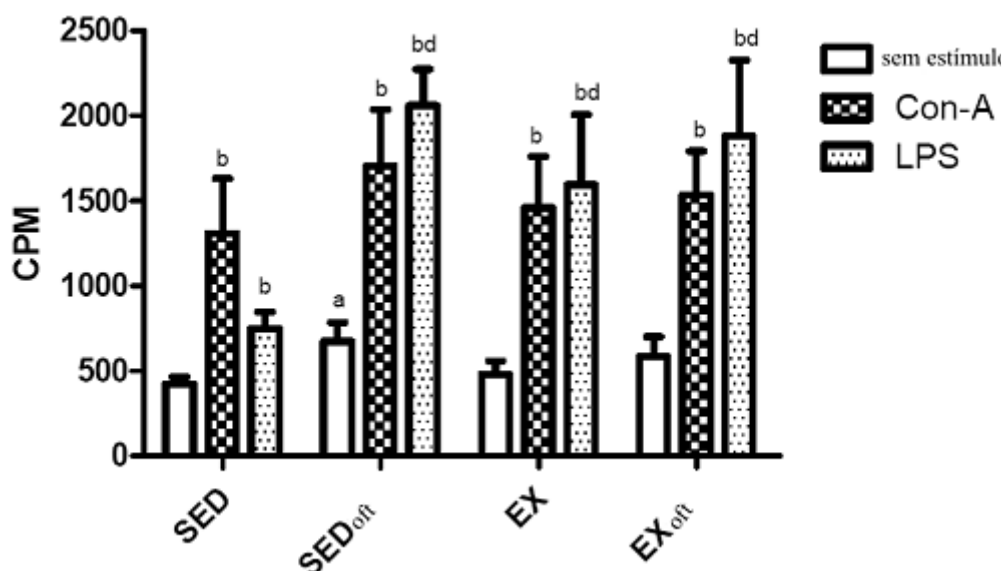


Figura 09. Proliferação em contagens por minuto (cpm) de linfócitos presentes no timo dos 4 grupos experimentais (SED, SEDoft, EX e EXoft). ( $P < 0,05$ ) após 48 h de incubação na presença de ConA ou LPS. Os dados representam a média  $\pm$  EPM 20, 20, 17 e 19 animais dos grupos SED, SEDslo, EX e EXslo respectivamente.

a- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo SED sem estímulo.

b- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado a proliferação basal em seu grupo sem estímulo.

d- Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado a proliferação basal em seu grupo sem estímulo. Basal versus LPS.

#### 4. DISCUSSÃO

O exercício físico pode induzir tanto ao ganho ou perda de massa corporal. Esta característica depende da intensidade, duração e principalmente do tipo de exercício. Os resultados aqui apresentados demonstraram que após 6 semanas de exercício, ambos os grupos (SED, SEDoft, EX e EXoft) aumentaram a massa corpórea, porém menor que o verificado nos grupos sedentários. Nós sugerimos que este pequeno aumento de peso (~10%) nos ratos exercitados poderia ser atribuído ao seu grande dispêndio energético diário. Além disso, a inclusão de óleo na dieta, como o óleo de fígado de tubarão, não induziu a um ganho de peso corporal como efeito colateral, o qual poderia ser uma preocupação entre os atletas.

Foi também bem documentado que a dieta com gordura e com ácidos graxos induz a alterações em muitos componentes do sistema imunitário (PIZZATO *et al.*, 2006; CALDER 2001; 2002; MEKSAWAN *et al.*, 2004; HILL *et al.*, 2008). Especificamente, a suplementação crônica com OFT, o qual representa uma rica fonte de alquilgliceróis, têm sido ligada a uma melhora na função imunitária, incluindo aumento na resposta de macrófagos (BERDEL, 1987), neutrófilos (PALMBLAD *et al.*, 1990) e linfócitos (HOMMA; NIEMAN, 1994). De um modo similar, muitos estudos têm indicado que o treinamento também melhora a função imunológica (NIEMAN, 1994; 1997; PEDERSEN, 2000; BACURAU *et al.*, 2007; LEANDRO *et al.*, 2007; LEVADA-PIRES *et al.*, 2007). Entretanto, nenhum estudo foi realizado para se avaliar o efeito da combinação ou associação da suplementação de OFT e do treinamento sobre a função imunitária. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da suplementação crônica com OFT sobre as respostas imunitárias de ratos treinados.

Os macrófagos exercem um papel crítico como primeira linha de defesa do hospedeiro contra invasores microbianos pela sua capacidade fagocítica, citotóxica e de exterminar o agente invasor (SUGIRA, 2001; ADAMS; HAMILTON, 1984). Além disso, os macrófagos são importantes também por atuarem como células apresentadoras de antígenos (MOURA *et al.*, 2002). Os neutrófilos constituem a primeira barreira de defesa contra infecção devido à habilidade dessas células em migrar rapidamente para o local de infecção (LEVADA-PIRES *et al.*,

2007). Embora estudos anteriores tenham reportado que a estimulação direta por OFT ou estimulação indireta por alquilgliceróis poderiam também modificar a funcionalidade de neutrófilos (PALMBLAND *et al.*, 1990, LEWKOWICZ *et al.*, 2005), nossos resultados mostram que a suplementação crônica com OFT não foi capaz de alterar a capacidade fagocítica, volume lisossomal e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais e neutrófilos sanguíneos de ratos treinados e sedentários (Tabelas 01 e 02). Estes resultados não são corroborados por outros estudos que demonstraram melhora na funcionalidade de macrófagos após estimulação por alquilglicerol, um componente éter lipídeo encontrado no OFT (HOMMA; YAMAMOTO, 1990; YAMAMOTO; NGWENYA, 1987, YAMAMOTO *et al.*, 1988). Nós acreditamos que esses achados diferentes possam ser explicados pelos diferentes tipos de abordagem utilizados. Yamamoto *et al.* (1988) investigou *in vitro* as atividades de macrófagos peritoneais residentes. Nosso estudo, por outro lado, investigou a atividade *ex vivo* dessas células imunitárias. Portanto, abordagens *in vitro* e *ex vivo* poderiam ser a razão por estas diferenças observadas.

Os linfócitos constituem os componentes primários da resposta imunológica adaptativa, sendo composto pelos linfócitos B e T (PALMBLAD *et al.*, 1990). A determinação da resposta proliferativa de linfócitos sob estimulação com vários mitógenos *in vitro* é um ensaio bem estabelecido para examinar a capacidade funcional de linfócitos B e T (NIEMAN, 1994). Nós investigamos a proliferação de linfócitos obtidos de órgãos linfóides secundários (timo, baço e linfonodo) com o propósito de verificar se a resposta imunológica adaptativa poderia ser modulada pelo treinamento e/ou possivelmente pela suplementação em um diferente modelo (HOFFMAN-GOETZ *et al.*, 1989; FERRY *et al.*, 1991). Primeiro, nós demonstramos que a proliferação basal de linfócitos foi aumentada pela suplementação e pelo exercício físico, o qual é fascinante. Posteriormente, quando um mitógeno estimulador foi adicionado ao meio de cultura, as células se proliferaram ainda mais. Entretanto, a proliferação de linfócitos associados ao intestino foi similar entre os grupos experimentais, sendo que no baço e timo a proliferação linfocitária foi significativamente diferente entre os 4 grupos experimentais. Portanto, os linfócitos obtidos de diferentes regiões possivelmente contribuem para os resultados controversos em relação ao treinamento e funcionalidade de linfócitos (KWAK, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; THARP; PREUSS, 1991; HOFFMAN-GOETZ *et al.*, 1989; FERRY *et al.*, 1991; PEIJIE *et al.*, 2003). Esses achados e suas diferenças nos

levam ao seguinte questionamento: pode-se utilizar células de um determinado órgão linfóide e projetar sua resposta como sendo de todo o sistema imunitário? Nossa resposta é de que não. Assim, nós acreditamos que estudos buscando informações sobre a funcionalidade do sistema imunitário utilizando células de diferentes órgãos linfóides devem ser cuidadosamente interpretados, reforçando a idéia de que o comportamento funcional de linfócitos obtidos de um órgão linfóide em particular não deve ser tomado como padrão para todas as diferentes populações linfocitárias.

Em concordância com prévios estudos (HOMMA; YAMAMOTO, 1990; PEDERSEN; TOFT, 2000; THARP; PREUSS, 1991; PEIJIE *et al.*, 2003; PEDRONO *et al.*, 2004) nossos resultados demonstraram que a suplementação com OFT e o treinamento moderado, aumentaram a proliferação de linfócitos do timo e baço de ratos, exceto nos linfócitos associados ao intestino. No entanto, nenhum efeito sinérgico da combinação entre suplementação de OFT e treinamento moderado sobre a resposta proliferativa de linfócitos foi verificado. Isto sugere que ambos os “tratamentos” (exercício e suplementação com OFT) poderiam compartilhar a mesma via de sinalização celular para a ativação da proliferação linfocitária. Estudos posteriores deveriam ser realizados a fim de testar esta hipótese.

Sabe-se, até o momento, que os alquilgliceróis exercem influência sobre a atividade da quinase protéica C (PK-C) (HEYMANS *et al.*, 1987; ROBINSON *et al.*, 1995), enzima envolvida no controle da proliferação e diferenciação celular (PUGLIESE *et al.*, 1998). A quinase protéica C encontra-se amplamente distribuída entre os órgãos e tecidos, sendo encontrada inclusive em altas concentrações no cérebro (NISHIZUKA, 1984). A ativação da PK-C é bioquimicamente dependente e fisiologicamente independente de  $\text{Ca}^{+2}$ , sendo esta normalmente uma proteína citosólica solúvel inativa. Através da ação de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , a PK-C liga-se a uma porção da membrana plasmática onde é ativada pelo 1,2 diacilglicerol (DARNELL *et al.*, 1990). Também, de acordo com Heymans *et al.*, (1987) estruturas análogas ao diacilglicerol, possuindo ligação éter na posição 1 do glicerol, não são funcionalmente eficientes para a ativação da PK-C, enquanto que as mesmas estruturas, no entanto com ligação éter na posição 2 do glicerol e ligação éster na posição 1, permitem a ativação da PK-C. O diacilglicerol, sendo um importante ativador fisiológico da PK-C, encontra-se elevado durante a proliferação celular,

quando comparado a células quiescentes (WHATLEY *et al.*, 1993; BANFIC *et al.*, 1993), sugerindo que este composto contribui para a regulação da atividade basal da PK-C durante alterações no crescimento celular (WARNE *et al.*, 1995).

A ativação de linfócitos T é um evento essencial da resposta imunológica, onde numerosos fatores de transcrição são estimulados resultando na expressão gênica de IL-2 e outras citocinas. De fato, uma potencializada transcrição gênica é mediada por segundos mensageiros como o cálcio, onde um aumento na sua concentração livre no citossol está relacionado à transcrição de diversos genes, engatilhando desta forma um sinal responsável pela ativação de células T, sendo que a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  depende do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e de sua liberação dos estoques intracelulares (PEDRONO *et al.*, 2004). De acordo com este mecanismo, o  $\text{Ca}^{2+}$  seria primeiramente liberado do meio intracelular após a ativação de receptor de antígeno, principalmente do retículo endoplasmático, sendo então liberado para o meio extracelular (PUTNEY, 1990). Pedrono *et al.*, (2004) ao utilizar células T “Jukart” de humanos (linhagem linfocitária leucêmica) verificou que os alquilgliceróis poderiam potencializar o influxo de cálcio através, em parte, da abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes, através de uma alta e rápida despolarização na membrana plasmática dessas células.

Tomados juntos, esses estudos demonstram o envolvimento dos alquilgliceróis em via de sinalização intracelular, além disso, considerando que estes compostos ocorram naturalmente nas células, esses resultados apontam ainda para um potencial papel regulador observado nesses compostos.

## **5. CONCLUSÃO**

O principal achado deste estudo foi que a suplementação com OFT, o exercício físico e sua associação não causaram efeito sobre a resposta imunológica inata, mas aumentou significativamente a proliferação de linfócitos (resposta imunológica adaptativa).

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. Editora Revinter. Quarta edição, 2003.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 283-318.

ANDO, K.; KODAMA, K.; KATO, A.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Antitumor activity of glyceryl ethers. **Cancer Research**, v. 321, p. 125-129, 1972.

ARMSTRONG, R. B. Initial events in exercise-induced muscular injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 22, p. 429-435, 1990.

AKIMOTO, T.; FURUDATE, M.; SAITOH, M.; SUGIURA, K.; WAKU, T.; AKAMA, T.; KONO, I. Increased plasma concentrations of intercellular adhesion molecule-1 after strenuous exercise associated with muscle damage. **European Journal of Applied Physiology**, v. 86, p. 185-190, 2002.

BACURAU, A. V., BELMONTE, M. A., NAVARRO, F., MORAES, M. R., PONTES, L. F. Jr., PESQUERO, J. L., ARAÚJO, R. C., BACURAU, R. F. Efeitos de um treinamento de alta intensidade sobre a função e metabolismo de macrófagos e linfócitos de ratos portadores de tumor de Walker 256. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p.1289-1299, 2007.

BAGBY, G. J.; CROUCH, L. D.; SHEPHERD, R. E. Exercise and cytokines: spontaneous and elicited responses. In: HOFFMAN-GOETZ, L. **Exercise and immune function**, Boca Raton: CRC Press, p. 55-77, 1996.

BANFIC, H.; ZIZAK, M.; DIVECHA, N.; IRVINE, R. F. Nuclear diacylglycerol is increased during cell proliferation in vivo. **The Biochemical journal**, v. 290, p. 633-636, 1993.

BAUM, M.; LIESES, H.; ENNEPER, J. Leukocytes, lymphocytes, activation parameters and cell adhesion molecules in middle-distance runners under different training conditions. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, p. 122-126, 1994.

BERGUER, R.; BRAVO, N.; BOWYER, M.; EGAN, C.; KNOLMAYER, T.; FERRICK, D. Major surgery suppresses maximal production of helper T-cell type 1 cytokines without potentiating the release of helper T-cell type 2 cytokines. **Archives of Surgery**, v. 134, p. 540-5444, 1999.



BLERGSTROM, S.; BLOMSTRAND, R. The intestinal absorption and metabolism of chimyl alcohol in the rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 38, p. 166, 1956.

BLANK, M.L.; CRESS, E.A.; SMITH, Z.L.; SNYDER, F. Dietary supplementation with ether-linked lipids and tissue lipid composition. **Lipids**, v. 26, p. 166-169, 1991.

BLOTTA, M. H.; DEKRUYIFF, R. H.; UMETSU, D. T. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD+4 lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 5589-5595, 1997.

BORDIER, C. G.; SELLIER, N.; FOUCAULT, A. P. ; LE GOFFIC, F. Purification and characterization of deep sea shark *Centrophorus squamosus* liver oil 1-O-alkylglycerol ether lipids. **Lipids**, v. 31, p. 521-529, 1996.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 5, p. 9-15, 1976.

BROHULT, A. Alkoxyglycerol-esters in irradiation treatment. **Nature**, v. 193, n. 4822, 1962.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Effect of irradiation and alkoxyglycerol treatment on the formation of antibodies after Salmonella vaccination. **Experientia**, v. 28, p. 954-959, 1972.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S.; JOELSON, I. Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 56, p. 441-448, 1977.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S.; JOELSSON, I. Reduced mortality in cancer patients after administration of alkylglycerols. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 65, p. 779-785, 1986.

BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training**, v. 41, p. 457-465, 2006.

CALDER, P.C. N-3 fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, v. 21, p. 309-341, 2001.

CARBALLERA, N. M. New advances in the chemistry of methoxylated lipids. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 437-456, 2002.

CANNON, J. G.; ORENCOLE, S. F.; FIELDING, R. A.; MEVDANI, M.; MEVDANI, S. N.; FIATARONE, M. A.; BLOMBERG, J. B.; EVANS, W. J. Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. **American Journal of Physiology**, v. 259, p. R1214-R1219, 1990.

CANNON, J. G.; ST PIERRE, B. A. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 179, p. 159-167, 1998.

CASTELL, L.M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? **Nutrition**, v. 18, p. 371-375, 2002.

CHEMINADE, C.; GAUTIER, V.; HICHAMI, A.; ALLAUME, P.; LANNOU, D.; LEGRAND, B. A. 1-O-Alkylglycerols improve boar sperm motility and fertility. **Biology of reproduction**, v.66, p.421-428, 2002.

COHN, Z. A. The macrophage- Versatile element of inflammation. **Harvey Lecture**, v. 77, p. 63, 1982.

CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; PENDERGAST, W.; CHANT, J. H. The activity of alkyl phosphorycholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochemichal Pharmacology**, v. 36, p. 2633-2636, 1987.

CURI, TC.; DE MELO, MP.; PALANCH, AC., MIYASAKA, AK., CURI., R. Percentage of phagocytosis, production of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO, and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. **Cell Biochemistry in Function**, v.16, p. 43-49, 1998.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. Molecular cell biology. **W H Freeman Company**, New York, p. 742, 1990.

DAVENPORT, S.; DEPREZ, P. Market opportunities for shark liver oil. **Australian Fish**, v. 48, p. 8-10, 1989.

DETMERS, P. A.; LO, S. K.; OLSEN-EGBERG, E.; WALZ, A.; BAGGIOLINI, M.; COHN, Z. A. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 171, p. 1155-1162, 1990.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. In: THOMSON, A. W. The cytokine handbook. London: **Academic Press**, p. 31-56, 1994.

EKBLOM, B.; EKBLOM, O.; MALM, C. Infectious episodes before and after the marathon race. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 16, p. 287-293, 2006.

FITZGERALD, L. Exercise and the immune system. **Immunology Today**, v. 9, p. 337-339, 1988.

FORD, D. A.; MIYAKE, R.; GLASSER, P. E.; GROSS, R. W. Activation of protein kinase C by naturally occurring ether-linked diglycerides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 13818-13824, 1989.

GLEESON, M. Mucosal immune responses and risk of respiratory illness in elite athletes. **Exercise Immunology Review**, v. 6, p. 5-42, 2000.

GLEESON, M. immune function in sport and exercise. **Journal Applied Physiology**, v.103, p.693-699, 2007.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. L.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 21-27, 2001.

GOBATTO, C. A.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; LUCIANI, E.; KOKUBUN, E.; MELLO, M. A. R. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos wistar. **Motriz**, v.7, p.57-62, 2001.

GRIMBLE, R.F. Dietary lipids and the inflammatory response. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 535-542, 1998.

GURR, M. Polyunsaturated fatty acids of the n-3 family: influence on inflammatory disease. **Lipid Technology**, v. 5, p. 65-68, 1993.

HADVARY, P.; BAUMGARTNER, H. R. Activation of human and rabbit blood platelets by synthetic structural analogs of platelet activating factor. **Thrombosis Research**, v. 30, p. 143-156, 1983.

HANAHAN, D. J.; MUNDER, P. G.; SATUOCHI, K.; McMANUS, L.; PINCKARD, R. N. Potent platelet stimulating activity of enantiomers of acetyl glyceril ether phosphorylcholine and its methoxy analogues. **Biochemichal and Biophysical Research Community**, v. 1, p. 183-188, 1981.

HALLGREN, B. Therapeutic effects of ether lipids. **Ether Lipids**, New York: Academic Press, 1983.

HALLGREN, B.; LARSSON, S. The glycerol ethers in the liver oils of elasmobranch fish. **Journal of Lipid Research**, v. 3, p. 31-38, 1962.

HALLGREN, B.; NIKLASSON, A.; STALLBERG, G.; THORIN, H. On the occurrence of 1-O-alkylglycerols and 1-O-(2-methoxyalkyl) glycerols in human colostrum, Human milk, cow's milk, sheep's milk, human red bone marrow, red cells, blood plasma and a uterine carcinoma. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 28, p. 1029-1034, 1974.

HALLGREN, B.; STALLBERG, G.; BOERYD, B. Occurrence synthesis and biological effects of substituted glycerol ethers. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, v. 16, p. 45-58, 1978.

HEATH, G. W.; FORD, E. S.; CRAVEN, T. E.; MACERA, C. A.; JACKSON, K. L.; PATE, R. R. Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. **Medicine Science in Sports Exercise**, v.23, p.152-157, 1991.

HERMMANN, B. J.; NEUMMAN, H. A. Cytotoxic ether phospholipids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 7724-7727, 1986.

HEYMANS, F.; DA SILVA, C.; MARREC, N.; GODFROID, J. J.; CASTAGNA, M. Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase. **FEBS Letters**, v. 218, p.35-40, 1987.

HOFFMAN, D. R.; UAUY, R. Essentiality of dietary omega-3 fatty acids for premature infants: plasma and red blood cells fatty acid composition. **Lipids**, v. 27, p. 886-894, 1992.

HOMMA, S.; YAMAMOTO, N. Activation process of macrophages after in vitro treatment of mouse lymphocytes with dodecylglycerol. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 79, p. 307-313, 1990.

JILMA, B.; EICHLER, H. G.; STOHLAWETZ, P.; DIRNBERGER, E.; KAPIOTIS, S.; WAGNER, O. F.; SCHULTZ, W.; KREJCY, K. Effects of exercise on circulating vascular adhesion molecules in healthy men. **Immunobiology**, v. 197, p. 505-512, 1997.

KAPLANSKI, G.; FARNARIER, C.; KAPLANSKI, S.; PORAT, R.; SHAPIRO, L.; BONGRAND, P.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. **Blood**, v. 84, p. 4242-4248, 1994.

KELLEY, D. S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17, 669-673, 2001.

KROTKIEWSKI, M.; PRZYBYSZEWSKA, M.; JANIK, P. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer). **Medical Science Monitor**, v. 9, p. 131-135, 2003.

KWAK, Y. S. Effects of training on spleen and peritoneal exudates reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise. **Journal of Sports Sciences**, v.24, p.973-978, 2006.

LEANDRO, C. G.; de LIMA, T. M.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; do NASCIMENTO, E.; MANHAES de CASTRO, R.; de CASTRO, C. M.; PHITON-CURI, T. C.; CURI, R. Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. p. 4-7, 2007.

LE BLANC K. ; SAMULSSON, J.; BROHULT, J. BERG, A. ; PALMBLAD, J. 1-O-Hexadecyl-2-methoxy-glycer-3-phosphatidylcholine – A methoxy ether lipid inhibiting platelet activating factor-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, p. 1577-1582, 1995.

LEIGHTON, B.; COOPER, G. L. S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, v. 335, p.632-635, 1989.

LEVADA-PIRES, A. C.; LAMBERTUCCI, R. H.; MOHAMAD, M.; HIRABARA, S. M.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Exercise training raises expression of the cytosolic components of NADPH oxidase in rat neutrophils. **European Journal of Applied Physiology**, v. 100, p.153-160, 2007.

LIU, X.; SPOLARICS, Z. Methemoglobin is a potent activator of endothelial cells by stimulating IL-6 and IL-8 production and E-selectin membrane expression. **American Journal of Physiology**, v. 285, p. 1036-1046, 2003.

LARRABEE, R. C. Leucocytosis after violent exercise. **Journal of Medical Research**, v.7, p.76-82, 1902.

MACKINNON, L. T. Chronic exercise training effects on immune function. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, p. S369-S376, 2000.

MADHAVI, N.; DAS, V.N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vinorelbine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Lett**, v. 84, p. 31-41, 1994.

MARBERG, CM.; WILES, HO. Granulocytopoietic fraction of yellow bone marrow. **Archives of Internal Medicine**, v. 61, p. 408, 1938.

McINTYRE, D. L.; REID, W. D.; LYSTER, D. M.; McKENZIE, D. C. Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. **European Journal of Applied Physiology**, v. 81, p. 47-53, 2000.

McINTYRE, D. L.; REID, W. D.; McKENZIE, D. C. Delayed muscle soreness: the inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. **Sports Medicine**, v. 20, p. 24-40, 1995.

MACKINNON, L. T., HOOPER, S. L. Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. **Medicine Science in Sports Exercise**, v. 28, p. 285-290, 1996.

MALM, C.; NYBERG, P.; ENGSTROM, M. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. **Journal of Physiology**, v. 529, p. 243-262, 2000.

MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 16, p. 4-6, 2006.

MATTHEWS, C.E.; OCKENE, I. S.; FREEDSON, P. S.; ROSAL, M. C.; MERRIAN, P. A.; HEBERT, J. R. Moderate to vigorous physical activity and the risk of upper-respiratory tract infection. **Medicine and Science in Sports Exercise**, v. 34, p. 1242-1248, 2002.

MEKSAWAN, K.; VENKATRAMAN, J. T.; AWAD, A. B.; PENDERGAST, D. R. Effect of dietary fat intake and exercise on inflammatory mediators of the immune system in sedentary men and women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, p. 331-340, 2004.

NATHAN, C. F. Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. **Trans Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 620-630, 1983.

NAVARRO-GARCIA, G.; PACHECO-AGUILAR, R.; VALLEJO-CORDOVA, B.; RAMIREZ-SUAREZ, J. C.; BOLANOS, A. Lipid composition of the liver oil of shark

species from the Caribbean and Gulf of California water. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13. p. 791-798, 2000.

NGWENYA, B. Z.; FOSTER, D. M. Enhancement of antibody production by lysophosphatidylcholine and alkylglycerol. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 196, p. 69-75, 1991.

NIEMAN, D.; JOHANSEN, L.M.; LEE, J.W. ARABATZIS, K. Infectious episodes before and after the Los Angeles marathon. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 30, p. 289, 1990.

NIEMAN, D. C. Exercise, infection and immunity. **International Journal of Sports Medicine**, v.30, p.131-141, 1994.

NIEMAN, D. C.; MILLER, A. R.; HENSON, D. A.; WARREN, B. J.; GUSEWITCH, G.; JOHNSON, R. L.; DAVIS, J. M.; BUTTERWORTH, D. E.; HERRING, J. L.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L. Effect of high-versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, p. 199-206, 1994.

NIEMAN, D. C. Immune response to heavy exertion. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, p. 1385-1394, 1997.

NIEMAN, D. C. Risk of upper respiratory tract infection in athletes: an epidemiologic and immunologic perspective. **Journal of Athletic Training**, v.32. p.344-349, 1997.

NIEMAN, D. C. Is infection risk linked to exercise workload? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.32, p.406-411, 2000.

NISHIZUKA, Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. **Science**, v. 225, p. 1365-1370, 1984.

NGWENYA, B. Z.; FOSTER, D. M. Enhancement of antibody production by Lysophosphatidylcholine and alkylglycerol. **PSEBM**, v. 196, p. 69-75, 1991.

NGUYEN, H. X., TIDBALL, J. G. Interação entre neutrófilos e macrófagos promove morte de macrófagos de células musculares de ratos *in vitro*. **Journal of Physiology**, v.547, p.125-132, 2003.

NUNES, E. A.; BONATTO, S. J.; DE OLIVEIRA, H. H.; RIVERA, N. L.; MAIORKA, A.; KRABBE, E. L.; TANHOFFER, R.; FERNANDES, L. C. The effect of dietary

supplementation with 9-cis:12-trans and 10-trans:12-cis conjugated linoleic acid (CLA) for nine months on serum cholesterol, lymphocyte proliferation and polymorphonuclear cells function in Beagle dogs. **Research Veterinary Science**, 2007.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ASP, S.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B. K. Pro and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **Journal of Physiology**, v. 515, p. 287-291, 1999.

PABLO, M.A.; PUERTOLLANO, M.A.; CIENFUEGOS, G.A. Immune cell function, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 323-328, 2000.

PALMBLAD, J.; SAMUELSSON, J.; BROHULT, J. Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 50, p. 363-370, 1990.

PEAK J. M. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. **Exercise Immunology Review**, v. 8, p. 49-100, 2002.

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **British Journal of Sports Medicine**, v. 34, p. 246-251, 2000.

PEDERSEN, B. K.; ULLUM, H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 26, p. 140-146, 1994.

PEDRONO, F.; CHEMINADE, C.; LEGRAND, A.B. Natural 1-O-alkylglycerols reduced platelet-activating factor-induced released of [3H]-serotonin in rabbit platelets. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 71, p. 19-23, 2004.

PETERS, E. M.; GOETZSCHE, J. M.; GROBBELAAR, B.; NOAKES, T. D. Vitamin C supplementation reduces the incidence of post-race symptoms of upper respiratory tract infection in ultramarathon runners. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.170-174, 1993.



PICK, E.; MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal Immunological Methods**, v.46, p. 211-226, 1981.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Technology in Fish Immunology**, v. 4, p. 93-100, 1995.

PIZATO, N.; BONATTO, S. J.; PICONCELLI, M. S.; SASSAKI, G. K.; NALIWAICO, K.; NUNES, E. A.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker tumor-bearing rats. **Nutrition**, v. 22, p. 425-432, 2006.

PUGLIESE, P. T.; JORDAN, K.; CEDERBERG, H.; BROHULT, J. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. **Journal Alternative Complement Medicine**, v.4, p.87-99, 1998.

PUTNEY, J. W. Capacitative calcium entry revisited. **Cell calcium**, v. 10, p. 611-624, 1990.

PYNE, D. B. Regulation of neutrophil function during exercise. **Sports Medicine**, v. 17, p. 245-258, 1994.

QUINDRY, J. C.; STONE, W. L.; KING, J.; BROEDER, C. E. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, p. 1139-1145, 2003.

REICHWALD, I.; MANGOLD, H.K. Assessment of the specificity of enzymatic reactions using mixed substrates: incorporation of alkylglycerols in the ionic alkoxy lipids of rat intestinal mucosa. **Nutrition and Metabolism**, v. 21, p. 198-201, 1977.

ROBINSON, M.; CHEN, T.; WARNE, T.R. IL-3-induced generation of alkylacylglycerol and diacylglycerol in an IL-3-dependent cell line. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 8, p. 2624-2629, 1991.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**, v. 43, p. 86-90, 1994.

ROMBALDI, A. J. **Alguns efeitos bioquímicos da ingestão de carboidrato líquido na realização de trabalho intermitente de alta intensidade em ratos**. 1996. Tese de doutorado. Departamento de Educação Física- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

ROWBOTTOM, D.G.; GREEN, K. J. Acute exercise effects on the immune system. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, p. S396-S405, 2000.

ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M.; FARIA, M. C.; LUCIANO, E. Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. **Motriz**, v. 10, p. 61-66, 2004.

SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, E. C.; COSTA ROSA, L. F. B. P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Sciences**, v.80, p.789-794, 2001.

SIU LO, J. C. R.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 8, p. 45-59, 1970.

SMITH, L. L.; McCAMMON, M.; SMITH, S.; CHAMNESS, M.; ISRAEL, R. G.; O'BRIEN, K. F. White blood cell response to uphill walking and downhill jogging at similar metabolic loads. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 58, p. 833-837, 1989.

SNYDER, F.; WOOD, R. Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues. **Cancer Research**, v. 29, p. 251-257, 1969.

STANSBY, M. E. Nutritional properties of fish oil for human consumption-modern aspects. IN: STANSBY, M. E. **Fish Oils in Nutrition**. New York: Ed.Van Nostrand Reinhold, 1990.

STEENBERG, A.; TOFT, A. D.; BRUUNGAARD, H.; SANDMAND, M.; HALKJAER-KRINSTENSEN, J.; PEDERSEN, B.K. Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1708-1712, 2001.

SUGIURA, H.; SUGIURA, H.; NISHIDA, H.; INABA, R.; MIRBOD, S. M.; IWATA, H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p.789-794, 2001.

TANIGUCHI, T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. **Science**, v. 268, p. 251-255, 1995.

TOFT, A. D.; THORN, M.; OSTROWKI, K.; ASP, S.; MOLLER, K.; IVERSEN, S.; HERMANN, C.; SONDRREGGARD, S. R.; PEDERSEN, B. K. N-3 polyunsaturated fatty acids do not cytokine response to strenuous exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.89, p. 2401-2406, 2000.

THARP, G. D.; PREUSS, T. L. Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress. **Journal Of Applied Physiology**, v.70, p. 2535-2538, 1991.

THOMAS, J. R.; NELSON, J. K.; SILVERMAN, S. J. Research methods in physical activity. **Champaign: Human Kinetics Books**, 2005.

UNGER, C.; EIBL, H.; KIM, D. J. Sensitivity of Leukemia cell lines to cytotoxic alkyllysophospholipids in relation to O-Alkyl cleavage enzyme activities. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 78, p. 219-222, 1987.

VASSILAKOPOULOS, T.; KARATZA, M.; KATSAOUNOU, P.; KOLLINTZA, A.; ZAKYNTHINOS, S.; ROUSSOS, C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, p. 1025-1032, 2003.

VED, H. S.; GUSTOW, E.; PIERINGER, R. A. Regulation of neuronal differentiation in neuron-enriched primary cultures from embryonic rat cerebra by platelet activating factor and the structurally related glycerol ether lipid, dodecylglycerol. **Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 353-358, 1991.

YAMAMOTO, N.; St CLAIR, D. A.; HOMMA, S.; NGWENYA, B. Z. Activation of Mouse Macrophages by Alkylglycerols, Inflammation Products of Cancerous Tissues. **Cancer Research**, v. 48, p. 6044-6049, 1988.

WARNE, T. R.; BUCHANAN, F. G.; ROBINSON, M. Growth-dependent accumulation of monoalkylglycerol in madin-darby canine kidney cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 11147-11154, 1995.

WELLER, A.; ISENMANN, S.; VESTWEBER, D. Cloning of the mouse endothelial selectins: expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 15176-15183, 1992.

WHATLEY, R. E.; STROUD, E. D.; BUNTING, M.; ZIMMERMAN, G. A.; McINTIRE, T. M.; PRESCOTT, S. M. Growth-dependent changes in arachidonic acid release from endothelial cells are mediated by protein kinase C and changes in diacylglycerol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 16130-16138, 1993.

WINKELMAN, C. Inactivity and inflammation in the critically ill patient. **Critical Care Clinics**, v. 23, p. 21-34, 2007.

WOODS, J. A.; LOWDER, T. W.; KEYLOCK, K. T. Can exercise improve immune function in the aged? **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 959, p. 117-127, 2002.